

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio De Janeiro

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular

Maria Beatriz Campos Castro da Costa Guedes

**Associação entre polimorfismos gênicos no metabolismo
lipídico e a evolução da história natural da infecção pelo vírus
da hepatite C**

Rio de Janeiro

2025

Maria Beatriz Campos Castro da Costa Guedes

Associação entre polimorfismos gênicos no metabolismo lipídico e a evolução da história natural da infecção pelo vírus da hepatite C

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia molecular.

Orientadora: Dra Luísa Hoffmann

Co-orientadora: Dra Juliene Antonio Ramos

Ficha catalográfica

Ficha catalográfica elaborada por
Anderson Moraes Chalaça
CRB7 5661

G934a Guedes, Maria Beatriz Campos Castro da Costa.
Associação entre polimorfismos gênicos no metabolismo
lipídico e a evolução da história natural da infecção pelo vírus da
hepatite C. / Maria Beatriz Campos Castro da Costa Guedes. – Rio
de Janeiro, 2025.
120 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em
Bioquímica e Biologia Molecular) – Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, 2025.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luísa Hoffmann.
Co-orientadora: Dr.^a Juliene Antonio Ramos

1. Hepatite C – Genética. 2. Polimorfismo (Genética). 3.
Lipídios - Metabolismo. I. Hoffmann, Luísa. III. Título.

IFRJ/CMAR/CoBib

CDU 616.36-022.7

Maria Beatriz Campos Castro da Costa Guedes

Associação entre polimorfismos gênicos no metabolismo lipídico e a evolução da história natural da infecção pelo vírus da hepatite C

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia molecular.

Orientadora: Dra. Luísa Hoffmann

Co-orientadora: Dra. Juliene Antonio Ramos

Rio de Janeiro, 11 de março de 2025.

Aprovado por

Documento assinado digitalmente



LUIZA HOFFMANN

Data: 14/03/2025 12:01:17-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Luísa Hoffmann (IFRJ) (Orientadora)

Documento assinado digitalmente



VANESSA DUARTE DA COSTA

Data: 17/03/2025 16:52:27-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Vanessa Duarte da Costa (FIOCRUZ) (Membro)

Documento assinado digitalmente



LUCAS VILLAS BOAS HOELZ

Data: 14/03/2025 13:46:12-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Lucas Villas Boas Hoelz (IFRJ) (Membro)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente Deus, por me dá forças e me guiar da melhor maneira possível todos os dias.

A minha mãe que acredita em mim e me provém o suporte financeiro para que eu possa estar dando continuidade a pós-graduação. As minhas irmãs que embora impliquem comigo, me arrancam boas gargalhadas quando estou à beira do estresse.

Ao meu filho de quatro patas que desde que chegou na minha vida, me fez ter mais um objetivo de vida, além de estar sempre estar pertinho de mim me oferecendo conforto nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai e meus avós que não estão mais nesse plano, mas tenho certeza de que estão muito felizes pela minha conquista. Aos meus tios, sobrinhos e primos que sempre torceram por mim em todas as etapas da minha vida.

Aos meus amigos de longa data, Lucas, Karen e Ana Carolina que estão comigo a mais de 10 anos e sempre me apoiaram e entenderem o porquê não vou a alguns eventos para poder estudar.

A minha orientadora Luísa Hoffmann que com seu jeito tranquilo e carinhoso sempre me acalma e diz que vai dar tudo certo, mesmo que as coisas não estejam tão bem assim. Obrigada por acreditar em mim e por ser essa pessoa tão incrível que está sempre disponível para seus alunos. Toda a sua dedicação e conhecimento foram fundamentais para o meu crescimento profissional. Agradeço também ao seu carro carinhosamente apelidado de “polinho” por carregar minhas placas de sequenciamento até o fundo.

A minha co-orientadora Juliene Ramos, a pessoa que mais puxa minha orelha na vida, mas está sempre disposta a sentar e explicar o que deve melhorar. Obrigada por acreditar no meu potencial e ter me acompanhado nessa jornada.

Aos meus colegas/irmãos do grupo HCV, Júlio, Thaís, Luan, Raíssa, Paulo e Manuel sem vocês, com certeza essa trajetória não teria sido tão incrível. Obrigada por todos os momentos que alegria que vocês me proporcionam diariamente. Todas as trocas de informações foram essenciais para minha formação.

As minhas colegas mais próximas do laboratório de genética molecular (LGM), em especial aquelas que estão todos os dias comigo, Isabella, Deborah e Carolina. Obrigada por todos os momentos divertidos, onde saíamos para comer um MC donalds ou tomar uma cervejinha e até mesmo pelas companhias até altas horas da noite com algum experimento. Viver esse momento com vocês foi uma das melhores coisas desses durante esses dois anos. Aos demais professores, alunos e monitores, muito obrigada por toda convivência e experiência compartilhada.

A minha banca de mestrado, composta pela Dra. Joanna Reis, Dr. Lucas Hoelz, Dra. Vanessa Duarte e Dra. Tatiana Nogueira. Agradeço a disponibilidade e por todas as futuras contribuições ao meu trabalho.

Ao IFRJ local onde pisei pela primeira vez em 2017 e ultimamente estava passando a maior parte dos meus dias, obrigada a toda direção e todos os docentes que mesmo

sob todas as dificuldades, trabalham arduamente para oferecer educação de qualidade para os alunos.

Ao laboratório de metabolismo macromolecular Firmino Torres de Castro localizado no instituto de biofísica da UFRJ, chefiado pela Dra. Rosane Silva e a todos os integrantes, principalmente a Maria Clara que sempre me ajudou nos sequenciamentos envio de resultados e ao técnico Cláudio que sempre me recebia com um café fresco e uma caixa de ponteira toda preenchida para eu utilizar.

A unidade genômica do instituto de Biofísica da UFRJ, especialmente a Dra Ana Beatriz Pacheco e as técnicas Polyanna e Carolina que me permitiram utilizar da centrífuga de placa do laboratório.

A SBBQ por proporcionar uma pós-graduação de qualidade e as agências de fomento (FAPERJ e CNPQ) que auxiliam no desenvolvimento de projetos bem como fornece as bolsas para ajuda de custo dos alunos.

Resumo

A hepatite C é um importante problema de saúde pública, afetando mais de 50 milhões de pessoas em todo o mundo. A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) tem consequências graves em longo prazo, uma vez que cerca de 70%-80% dos casos evoluem para a cronicidade, até 30% desenvolvem cirrose e 1%-4% ao ano evoluem para o carcinoma hepatocelular. O ciclo infeccioso do HCV está altamente associado ao metabolismo lipídico do indivíduo. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes envolvidos no metabolismo lipídico, tais como apolipoproteínas e lipoproteínas, são importantes fatores do hospedeiro que podem influenciar na evolução da infecção pelo HCV. Desta forma, o estudo concomitante de características clínicas (como o perfil metabólico) e os SNPs no metabolismo lipídico permite avaliar o papel destes polimorfismos genéticos como possíveis biomarcadores de prognóstico na hepatite C crônica. Além disso, podem contribuir para a redução das complicações clínicas e dos custos do sistema de saúde causados por esta infecção. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o papel dos SNPs em APOA1 rs964184, APOB rs1042034 e rs676210 e LDLR rs5925 em pacientes brasileiros e suas associações com diferentes desfechos clínicos frente à infecção crônica pelo HCV. Para isso, foram coletados dados de prontuários médicos de 109 pacientes com hepatite C e as amostras de DNA foram extraídas e dosadas. As genotipagens foram realizadas por amplificação por PCR seguida de sequenciamento nucleotídico convencional. Foi visto um desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos em APOB rs1042034 e rs676210, sendo assim, utilizamos apenas o rs1042034 para realizar as análises. A frequência de genótipos em APOA1 rs964184 é de 69,7% CC, 25,7% CG e 4,6% GG ($n = 109$ pacientes), de APOB rs1042034 é de 67% TT, 29,4 % CT e 3,7% CC ($n = 109$), e de LDLR rs5925 é de 51,9 % CT, 36,1% TT e 12,0% CC ($n = 108$). Foram encontradas associações entre os genótipos do polimorfismo em APOA1 rs964184 com carga viral pré-tratamento ($p = 0,0331$) e com níveis séricos de triglicerídeos ($p = 0,0340$). Também foram encontradas correlações entre o polimorfismo em LDLR rs5925 com níveis séricos de triglicerídeos ($p = 0,0052$) e com VLDL ($p = 0,0138$). Em APOB rs1042034 não foi vista nenhuma associação positiva com o HCV. Foram encontradas correlações positivas entre genótipo 1 e carga elevada pré-tratamento, alelo G rs964184 e triglicerídeos, diabetes e sexo masculino, diabetes e hipertensão, hipertensão e sexo masculino, triglicerídeos elevado e VLDL elevado. Foram encontradas 3 correlações negativas: IMC alto e fibrose grave pré-tratamento, IMC alto e cirrose pré-tratamento, RVS e evolução da doença hepática (fibrose pior após o tratamento). Os polimorfismos em APOA1 rs964184 e LDLR rs5925 podem ser considerados bons marcadores de fatores metabólicos do paciente. Entretanto, são necessários mais estudos para investigar a associação desses SNPs relacionados à hepatite C crônica. É importante também verificar a associação entre outros SNPs em outras apolipoproteínas para buscar um potencial biomarcador de prognóstico e condutor de tratamento para pacientes com hepatite C.

Palavras-chave- Hepatite C, biomarcadores, metabolismo lipídico, polimorfismos.

Abstract

Hepatitis C is a major public health problem, affecting more than 50 million people worldwide. Infection with hepatitis C virus (HCV) has serious long-term consequences, since around 70%-80% of cases progress to chronicity, up to 30% develop cirrhosis and 1%-4% per year progress to hepatocellular carcinoma. The HCV infection cycle is highly associated with the individual's lipid metabolism. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes involved in lipid metabolism, such as apolipoproteins and lipoproteins, are important host factors that can influence the evolution of HCV infection. In this way, the concomitant study of clinical characteristics (such as the metabolic profile) and SNPs in lipid metabolism makes it possible to evaluate the role of these genetic polymorphisms as possible prognostic biomarkers in chronic hepatitis C. In addition, they may contribute to reduce the clinical complications and health system costs caused by this infection. Therefore, this study aimed to evaluate the role of SNPs APOA1 rs964184, APOB rs1042034 and rs676210 and LDLR rs5925 in Brazilian patients and their association with different clinical outcomes in chronic HCV infection. For this, data were collected from the medical records of 109 patients with hepatitis C and DNA samples were extracted and measured. Genotyping was carried out by PCR amplification followed by nucleotide conventional sequencing. Linkage disequilibrium was observed between the APOB rs1042034 and rs676210 polymorphisms, and only rs1042034 was used for analysis. The frequency of APOA1 rs964184 genotypes is 69.7% CC, 25.7% CG and 4.6% GG (n = 109 patients), APOB rs1042034 is 67% TT, 29.4% CT and 3.7% CC (n = 109), and LDLR rs5925 is 51.9% CT, 36.1% TT and 12.0% CC (n = 108). Associations were found between the genotypes of the APOA1 rs964184 polymorphism with pre-treatment viral load ($p = 0.0331$) and with serum triglyceride levels ($p = 0.0340$). Correlations were also found between the LDLR rs5925 polymorphism with serum triglyceride ($p = 0.0052$) and with VLDL ($p = 0.0138$) levels. No positive association with HCV was observed in APOB rs1042034. Positive correlations were found between genotype 1 and high pre-treatment viral load, G allele at rs964184 and triglycerides, diabetes and male sex, diabetes and hypertension, hypertension and male sex, and high triglycerides and high VLDL. Three negative correlations were found: high BMI and severe fibrosis pre-treatment, high BMI and cirrhosis pre-treatment, and SVR and evolution of liver disease (worse fibrosis after treatment). The polymorphisms in APOA1 rs964184 and LDLR rs5925 can be considered promising biomarkers of the patient's metabolic factors. However, more studies will be needed to investigate the association of these SNPs with chronic hepatitis C. It is also important to verify the association between other SNPs in other apolipoproteins to look for a potential prognostic biomarker and treatment guide for patients with hepatitis C.

Keywords - Hepatitis C, biomarkers, lipid metabolism, polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vírus da hepatite C.....	19
Figura 2: Representação da organização genômica do vírus da hepatite C	21
Figura 3: Coeficiente de mortalidade por hepatite C no Brasil entre 2012 e 2022.....	23
Figura 4: Formação da partícula lipoviral entre o HCV e componentes do metabolismo lipídico do hospedeiro.....	24
Figura 5: Ciclo infeccioso do HCV.....	25
Figura 6: História natural da infecção pelo HCV.....	26
Figura 7: Fluxograma da investigação inicial utilizando teste rápido anti-HCV.....	28
Figura 8: Histórico do tratamento para hepatite C ao longo dos anos.....	31
Figura 9: Papel das APOs na morfogênese da LPV do HCV.....	33
Figura 10: Representação esquemática de SNP.....	36
Figura 11: <i>Cluster</i> gênico onde está localizado APOA1.....	37
Figura 12: Fórmula para cálculo de concentração de colesterol total.....	42
Figura 13: Fórmula para cálculo de concentração de triglicerídeos.....	43
Figura 14: Fórmula para cálculo de concentração de colesterol HDL.....	44
Figura 15: Fórmula para cálculo de concentração de colesterol VLDL.....	44
Figura 16: Fórmula para cálculo de concentração de colesterol LDL.....	44
Figura 17: Tabela de fatores que depende da quantidade de TG e Colesterol não HDL para o cálculo de LDL-colesterol pela Fórmula de Martin.....	45
Figura 18: Mapeamento da região do polimorfismo em APOB rs1042034.....	47
Figura 19: Mapeamento da região do polimorfismo em APOB rs676210.....	48
Figura 20: Mapeamento da região do polimorfismo em APOA1 rs964184.....	49
Figura 21: Mapeamento da região do polimorfismo em LDLR rs5925.....	50
Figura 22: Gel de agarose a 1,5% corado com GELRED. Fragmentos de DNA amplificado na região APOB rs1042034.....	59
Figura 23: Gel de agarose a 1,5% corado com GELRED. Fragmentos de DNA amplificado na região APOB rs676210.....	60

Figura 24: Gel de agarose a 1,5% corado com GELRED. Fragmentos de DNA amplificado na região APOA1 rs964184.....	60
Figura 25: Gel de agarose a 1,5% corado com GELRED. Fragmentos de DNA amplificado na região LDLR rs5925.....	61
Figura 26: Eletroferogramas dos genótipos encontrados na região em APOBrS1042034.....	62
Figura 27: Eletroferogramas dos genótipos encontrados na região em APOB rs676210.....	62
Figura 28: Eletroferogramas dos genótipos encontrados na região em APOA1rs964184.....	63
Figura 29: Eletroferogramas dos genótipos encontrados na região em LDLRrs5925.....	63
Figura 30: Genótipos em APOBrS676210 e APOBrS1042034.....	64
Figura 31: Frequência genotípica dos pacientes em APOBrS1042034.....	65
Figura 32: Frequência genotípica do grupo controle em APOBrS1042034.....	65
Figura 33: Frequência alélica dos pacientes em APOBrS1042034.....	66
Figura 34: Frequência alélica grupo controle em APOBrS1042034.....	66
Figura 35: Frequência genotípica dos pacientes em APOA1rs964184.....	67
Figura 36: Frequência genotípica do grupo controle em APOA1rs964184.....	67
Figura 37: Frequência alélica dos pacientes em APOA1rs964184.....	68
Figura 38: Frequência alélica do grupo controle em APOA1rs964184.....	68
Figura 39: Frequência genotípica dos pacientes em LDLR rs5925.....	69
Figura 40: Frequência genotípica do grupo controle em LDLRrs5925.....	69
Figura 41: Frequência alélica dos pacientes em LDLRrs5925.....	70
Figura 42: Frequência alélica do grupo controle em LDLR rs5925.....	70
Figura 43: Frequência de genótipos em APOA1 rs964184 por carga viral com valor de p significativo (0,0331) no teste Qui-quadrado em modelo aditivo.....	76
Figura 44: Frequência de genótipos em APOA1 rs964184 por carga viral com valor de p significativo (0,0419) no teste exato de Fisher em modelo dominante.....	77

Figura 45: Frequência de genótipos em APOA1 rs964184 por concentração de triglicerídeos com valor de p significativo (0,0340) por teste Qui-quadrado no modelo aditivo.....	78
Figura 46: Frequência de genótipos APOA1 rs964184 por concentração de triglicerídeos com valor de p significativo (0,0301) por teste exato de Fisher no modelo dominante.....	79
Figura 47: Frequência de genótipos em LDLR rs 5925 por triglicerídeos com valor de p significativo (0,0052) por teste Qui-quadrado no modelo aditivo.....	82
Figura 48: Frequência de genótipos em LDLR rs5925 por triglicerídeos com valor de p significativo (0,0021) por teste exato de Fisher no modelo dominante.....	83
Figura 49: Frequência de genótipos em LDLR rs5925 por VLDL com valor de p significativo (0,0138) por teste Qui-quadrado no modelo aditivo.....	83
Figura 50: Frequência de genótipos em LDLR rs964184 por VLDL com valor de p significativo (0,0020) por teste exato de Fisher no modelo Dominante.....	84
Figura 51: Mapa de calor da matriz de correlação com o valor r de Pearson.....	85
Figura 52: Mapa de calor da matriz de correlação com valores de p.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reação de amplificação da APOB rs1042034.....	47
Tabela 2: Reação de amplificação da APOB rs676210.....	48
Tabela 3: Reação de amplificação da APOA1 rs964184.....	50
Tabela 4: Reação de amplificação da LDLR rs5925.....	51
Tabela 5: Características clínico-laboratoriais e demográficas dos pacientes com hepatite C crônica.....	55
Tabela 6: Características laboratoriais e demográficas da população Controle.....	58
Tabela 7: Correlações de contingência no SNP APOBrS1042034.....	71
Tabela 8: Correlações de contingência no SNP APOA1rs964184.....	74
Tabela 9: Correlações de contingência no SNP LDLR rs5925.....	80
Tabela 10: Correlações positivas significativas entre as características avaliadas	86
Tabela 11: Correlações significativas negativa entre as características avaliadas	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
APO	Apolipoproteína
APOA	Apolipoproteína A
APOB	Apolipoproteína B
APOE	Apolipoproteína E
BOC	Boceprevir
CD81	do inglês <i>Cluster of differentiation 81</i>
CDC	Centro de Controle de Doenças (do inglês <i>Center for Disease Control and Prevention</i>)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHC	Carcinoma hepatocelular
DAA	Antiviral de ação direta (do inglês <i>direct-acting antiviral</i>)
DCV	Daclatasvir
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DSV	Dasabuvir
EBR	Elbasvir
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidérmico (do inglês <i>epidermic growth fator receptor</i>)
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ELISA	do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EphA2	do inglês <i>Ephrin type-A receptor 2</i>
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
GZR	Grazoprevir
GWAS	Estudos de Associação Genômica Ampla (do inglês <i>Genome-Wide Association Studies</i>)
HAV	Vírus da hepatite A (do inglês <i>hepatitis A virus</i>)
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B (do inglês <i>hepatitis B surface antigen</i>)
HBV	Vírus da hepatite B (do inglês <i>hepatitis B virus</i>)
HCV	Vírus da hepatite C (do inglês <i>hepatitis C virus</i>)
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês <i>high density lipoprotein</i>)

HIV	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>)
HNANB	Hepatite não-A não-B
HSPG	Proteoglicanos de sulfato de heparana (do inglês <i>heparan sulfate proteoglycans</i>)
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (do inglês <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária (do inglês <i>intermediate density lipoprotein</i>)
IFN	Interferon
IL28b	Interleucina 28b
IMC	Índice de massa corporal
IRES	Sítio interno de entrada do ribossomo (do inglês <i>internal ribosome entry site</i>)
LD	Gotículas lipídicas (do inglês <i>lipid droplets</i>)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês <i>low density lipoprotein</i>)
LDLR	Receptor de lipoproteína de baixa densidade (do inglês <i>low density lipoprotein receptor</i>)
LDV	Ledipasvir
LVP	Partícula lipoviral (do inglês <i>lipoviral particle</i>)
miR-122	MicroRNA-122
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MTP	Proteína microssomal de transferência de triglicérides (do inglês <i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>)
NCBI	Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NIH	Institutos Nacionais de Saúde (do inglês <i>National Institutes of Health</i>)
NR	Não respondedor
NS5B	RNA polimerase dependente de RNA
NTR	Região não traduzida (do inglês <i>non translated region</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Fase de leitura aberta (do inglês <i>Open Reading Frame</i>)
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas

PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polietilenoglicol
PEG-IFN	Interferon peguilado
PTV/r	Paritaprevir com ritonavir
QM	Quilomícrons
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo (do inglês <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RBV	Ribavirina
RE	Retículo endoplasmático
RVS	Resposta virológica sustentada
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SIM/SVSA/MS	Sistema de Informações sobre Mortalidade/Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente/Ministério da Saúde
siRNA	Pequeno RNA de interferência (do inglês, <i>Small Interfering RNA</i>)
SMV	Simeprevir
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SOF	Sofosbuvir
SRB1	Receptor scavenger, classe B tipo 1 (do inglês <i>Scavenger receptor class B type 1</i>)
ssRNA+	RNA fita simples de polaridade positiva (do inglês <i>positive-sense single-stranded RNA</i>)
TAG	Triacilglicerol
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Triglicerídeo
TLH	Tampão de lise de hemácias
TLN	Tampão de lise de núcleo
TR	Teste rápido
TVR	Telaprevir
VEL	Velpatasvir
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade (do inglês <i>very-low density lipoprotein</i>)
VOX	Voxilaprevir
ZPR1	Proteína dedo de zinco

Sumário

1. Introdução	18
1.1 A descoberta das hepatites e do vírus da hepatite C.....	18
1.2 Epidemiologia da hepatite C no Brasil e no mundo	22
1.3 O ciclo infeccioso do vírus da hepatite C	23
1.4 História natural da infecção pelo vírus da hepatite C	25
1.5 Formas de transmissão e diagnóstico da hepatite C.....	27
1.6 Tratamento da hepatite C	29
1.7 Interação do HCV com metabolismo lipídico.....	31
1.7.1 Apolipoproteína B.....	33
1.7.2 Apolipoproteína A.....	34
1.7.3 Receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR).....	34
1.8 Polimorfismos de Nucleotídeo Único	35
1.8.1 Nucleotídeos de Polimorfismo Único no metabolismo lipídico	36
2. Justificativa	38
3. Objetivos	39
3.1 Objetivo Geral	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
4. Metodologia.....	40
4.1 População de estudo e coleta de amostras	40
4.2 Avaliação de parâmetros laboratoriais lipídicos	41
4.2.1 Dosagem de Colesterol Total.....	42
4.2.2 Dosagem de Triglicerídeos	42
4.3.3 Dosagem de HDL	43
4.3.4 Cálculo LDL e VLDL.....	44
4.3 Extração de DNA Genômico.....	45
4.4 Amplificação da região contendo o polimorfismo em APOB rs1042034 por reação em cadeia da polimerase	46
4.5 Amplificação da região contendo o polimorfismo em APOB rs676210 por reação em cadeia da polimerase.....	48
4.6 Amplificação da região contendo o polimorfismo em APOA1 rs964184 por reação em cadeia da polimerase	49
4.7 Amplificação da região contendo o polimorfismo em LDLR rs5925 por reação em cadeia da polimerase.....	50

4.8 Confirmação da amplificação por eletroforese em gel de agarose a 1,5%	51
4.9 Sequenciamento automático dos produtos de PCRs para avaliação dos polimorfismos em genes de APOB, APOA1 e LDLR pelo método Sanger	52
4.10 Análise dos eletroferogramas e determinação da genotipagem	53
4.11 Análise estatística dos dados	53
5. Resultados.....	55
5.1 Dados laboratoriais e demográficos da população.....	55
5.2 Amplificação dos fragmentos de DNA	59
5.3 Análise dos eletroferogramas e determinação dos genótipos	61
5.4 Frequência Genotípica e Alélica na população estudada.....	64
5.5 Associações dos genótipos com características clínicas por análises em tabela de contingência.	71
5.5.1 Para APOBrs1042034.....	71
5.5.2 Para APOArs964184.....	73
5.5.3 Para LDLRrs5925	79
5.6 Análise de correlação de múltiplas variáveis entre características clínico-laboratorial e demográficos e os polimorfismos em APOBrs1042034, APOArs964184 e LDLRrs5925	84
6. Discussão	88
7. Perspectivas.....	94
8. Conclusão.....	95
9. Referências.....	96
ANEXOS.....	115

1. Introdução

1.1 A descoberta das hepatites e do vírus da hepatite C

Há cerca de 2500 anos atrás, os babilônicos já relatavam surtos de icterícia entre sua população. Esses surtos ocorreram por muito tempo e foram marcantes, principalmente no período de guerras e catástrofes humanas (PARANÁ & ALMEIDA, 2024). No século IV antes de Cristo (A.C.), Hipócrates descreveu a icterícia como uma doença de origem infecciosa que acometia o fígado devido ao acúmulo de líquido no abdômen, causado provavelmente por uma doença crônica nesse órgão. O termo hepatite foi introduzido pela primeira vez em 1725 por Bianchi, JB no trabalho denominado “*Historia hepatica sem Thoria et praxis omnius morborum hepatitis et bilis*” (FONSECA, 2010).

Com o avanço da ciência e com o aumento do número de casos, surgiu o interesse entre os médicos e pesquisadores da época em investigar mais sobre a causa dessa enfermidade. Diversas hipóteses sobre a patogênese dessa doença foram desenvolvidas com base em observações clínicas e autópsias. Foi sugerido em 1855 que a icterícia epidêmica era causada por uma inflamação no duodeno causado por uma obstrução biliar, introduzindo o termo “icterícia catarral” (BEENSON, 1979). Nesse mesmo ano, foi descrito um surto dessa “icterícia catarral” em diversos trabalhadores em um celeiro no porto de Bermen (Alemanha) e Jahn reportou uma grande quantidade de pessoas infectadas em um manicômio em Merzig também na Alemanha. Ambos os grupos tinham recebido a vacina derivada de linfa humana contra varíola (SCHMID, 2001).

Em 1909 novos casos de icterícia surgiram e foram associados ao uso de medicações injetáveis (PARANÁ & ALMEIDA, 2024). Durante a primeira guerra mundial, o médico austríaco Hans Eppinger, ao examinar o fígado de soldados alemães que estavam doentes com “icterícia catarral”, consolidou-se que, na verdade, a lesão era no parênquima do fígado, verificando assim a correlação entre o sinal clínico dos indivíduos e a doença hepática (BEENSON, 1979).

O primeiro vírus da família das hepatites virais foi descoberto em 1965 por Blumberg, Alter e Vinich, com a presença de um antígeno em soro de um aborígene australiano que reagia com soros de hemofílicos politransfundidos que foi inicialmente denominado de antígeno Austrália. Em seguida, foi demonstrada a relação desse antígeno com o vírus da hepatite B (HBV), sendo descrito posteriormente como antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) (pz *et al.*, 1967; FONSECA, 2010; IGLECIAS, 2015). O vírus da hepatite A (HAV) foi

descoberto em 1973 por Stephen Feinstone em fezes de voluntários presos em Washington, Estados Unidos (EUA). Em geral, o portador do HAV não progride para a cronicidade, dessa forma, foram necessários vários estudos em modelos experimentais e cultivo celular para o desenvolvimento de uma vacina atenuada (PARANÁ & ALMEIDA, 2024).

O vírus causador da hepatite C (**Figura 1**) foi primeiramente observado em doadores de sangue na década de 1980. Inicialmente, a "hepatite pós-transfusional não-A e não-B de transmissão parenteral" foi caracterizada como hepatite "não A e não B" (HNANB) (BARBOSA *et al.*, 2019). Posteriormente se fez necessária a utilização de métodos de DNA recombinante, com plasma de chimpanzés infectados com soro de pacientes positivos para HNANB (HOUGHTON, 2019). Em 1989, o médico Harvey J. Alter e os biólogos Charles M. Rice e Michael Houghton identificaram o agente causador dessa hepatite, e o denominaram de HCV (CHOO *et al.*, 1989). No ano de 2020, cerca de 31 anos após a descoberta, ganharam o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina (CONSELHO FEDERAL DE BIOLOGIA, 2020; NOBEL PRIZE PHYSIOLOGY OR MEDICINE, 2020).

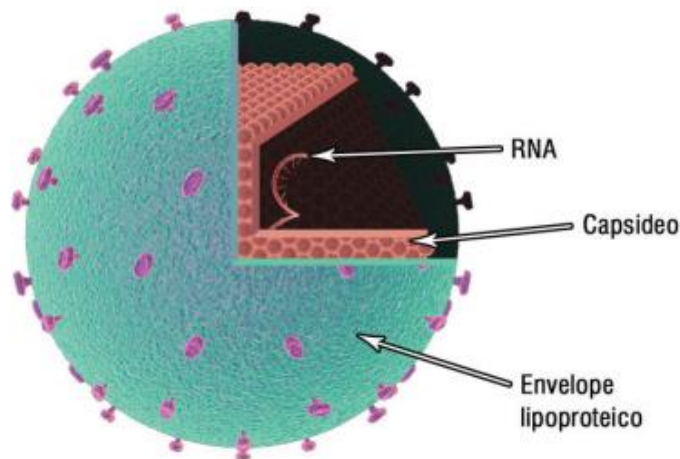


Figura 1: Vírus da hepatite C. Estrutura do vírus da hepatite C com envelope lipoproteico, capsídeo e RNA viral. Fonte: Brasil, Ministério da Saúde, manual técnico para diagnóstico de hepatites virais, 2018; Brasil, 2014.

O HCV pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus* (ICTV, 2024). É um vírus com cerca de 30 a 60 nm de diâmetro. O HCV é envelopado, ou seja, adquire uma camada lipídica durante a montagem da sua maquinaria viral e a saída do hepatócito, o que o torna menos resistente ao ambiente externo e facilita sua entrada nas células hospedeiras. Contudo, vírus envelopados conseguem “burlar” o sistema imune, dificultando o seu reconhecimento pelo

organismo do hospedeiro, favorecendo a replicação viral e, conseqüentemente, uma infecção sistêmica (VIROLOGY RESEARCH SERVICES, 2022).

O genoma viral é formado por RNA de simples fita e polaridade positiva (ssRNA+) com aproximadamente 9600 nucleotídeos. Seu genoma é composto por uma única fase de leitura aberta (ORF, do inglês *Open Reading Frame*) e uma região 5' região não traduzida (5' NTR, do inglês *non-translated region*), o qual inclui um sítio interno de entrada de ribossomo (IRES, do inglês *Internal Ribosome Entry Site*) capaz de direcionar a tradução do genoma viral para codificar uma única poliproteína de 3006 – 3037 aminoácidos. Além disso, na porção final, possui uma região 3' NTR (DI BISCEGLIE, 1999; BRASIL, MANUAL TÉCNICO PARA DIAGNÓSTICO DE HEPATITES VIRAIS, 2018).

Este vírus apresenta uma alta variabilidade genética principalmente devido à ausência de mecanismo de correção de erros da RNA polimerase dependente de RNA (NS5B). Dessa forma, possui uma taxa de 10^{-3} erros por sítio a cada etapa de replicação, levando assim à formação de quasispécies virais (KOHARA, 2017; CAO *et al.*, 2023).

A poliproteína gerada é processada por proteases virais e do hospedeiro e é dividida em três proteínas estruturais (*core*, E1 e E2) e sete proteínas não estruturais (P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B). A região amino-terminal é responsável por codificar as proteínas do envelope E1 e E2 que se associam e formam um complexo glicoproteico no exterior do vírus, sendo componentes essenciais para a entrada e fusão na célula hospedeira. E2 forma uma rede de interação com proteínas de superfície celular do hospedeiro que favorecem o reconhecimento (TORRENTS *et al.*, 2022) (GANTA *et al.*, 2018).

A proteína do *core* é a que forma o capsídeo, uma estrutura que protege o material genético do vírus. As proteínas não estruturais são codificadas pela porção carboxi-terminal da poliproteína e possuem funções essenciais, como replicação do HCV, processamento da poliproteína, modulação do mecanismo de defesa do hospedeiro e montagem da partícula viral (LINDENBACH & RICE 2013) (**Figura 2**).

A proteína não-estrutural p7 é uma proteína de membrana integral importante para a ligação dos domínios transmembranares de α -hélice. Está envolvida na infecciosidade viral que depende de mutações nesta proteína (SAKAI *et al.*, 2003). A proteína NS2 é responsável pela associação do vírion à membrana do retículo endoplasmático (RE). Junto com a NS3 forma uma metaloprotease dependente de zinco, clivando o local entre NS2 e NS3 na poliproteína (CHEVALIEZ & PAWLOTSKY 2006). A NS3 helicase/NTPase tem várias

funções no RNA viral como a estimulação, ligação e desenrolamento. Entretanto, essa atividade só se inicia quando a NS4A está ligada a ela, atuando como cofator. NS3-NS4A protease é essencial para o ciclo infeccioso do HCV, pois catalisa a clivagem da poliproteína nas junções NS3/NS4A, NS4A/NS5B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B (GANTA *et al.*, 2018). A NS4B é uma proteína transmembrana localizada na membrana do RE que tem como função servir de âncora de membrana para o complexo de replicação. A NS5A tem um importante papel na regulação das vias celulares e na replicação viral. Foi visto que mutações na sequência dessa proteína gera inibição na replicação do HCV (CHEVALIEZ & PAWLOTSKY, 2006). A NS5B é uma RNA polimerase dependente de RNA que catalisa a polimerização de trifosfatos de ribonucleosídeos (rNTP) durante a replicação (HEPATITIS C ONLINE, 2024).

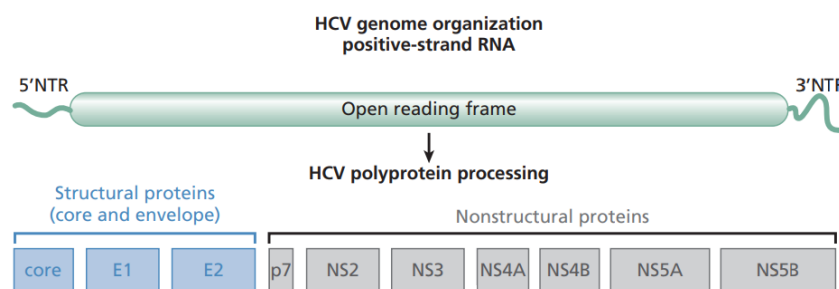


Figura 2: Representação da organização genômica do HCV. Região 5' NTR, única ORF mostrando a região traduzida na poliproteína e região 3' NTR. Após o processamento, a poliproteína é clivada em 3 proteínas estruturais: CORE, E1 e E2 e 7 proteínas não estruturais: P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B. Fonte: Adaptado de Rice, 2011.

Atualmente são descritos 8 genótipos do HCV (classificados em números de 1 a 8) (BORGIA *et al.*, 2018), sendo aproximadamente 30 a 35% divergentes em sua sequência nucleotídica, e em torno de 90 subtipos (representando as letras após os números dos genótipos), que diferem cerca de 15% entre si (BORGIA *et al.*, 2018; MBISA *et al.*, 2024). O genótipo 1 e o subtipo 1b são os mais prevalentes no mundo, seguido do genótipo 3 (BULUT *et al.*, 2021).

Como já dito anteriormente, o HCV é altamente mutável e à medida que ocorre a replicação viral, existe uma elevada taxa de erro que promove a formação de quasispécies virais, que representam subpopulações virais heterogêneas, porém intimamente relacionadas num mesmo indivíduo. Desse modo, conferindo vantagens adaptativas como o favorecimento do escape às

respostas imunitárias do hospedeiro e resistência aos antivirais (MARTELL *et al.*, 1992; TSUKIYAMA-KOHARA & KOHARA, 2017; FUKARA & YAMAMOTO, 2017).

Devido à alta diversidade genética do vírus, o desenvolvimento de uma vacina como medida profilática se torna mais difícil. Ao longo desses anos, algumas estratégias para induzir imunidade humoral e/ou mediada por células foram descritas. Apenas três prosseguiram para a fase de testes pré-clínicos e clínicos em humanos e nenhuma se mostrou eficaz (YECHEKZEL *et al.*, 2021).

1.2 Epidemiologia da hepatite C no Brasil e no mundo

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a hepatite C acomete em torno de 50 milhões de pessoas em todo o mundo. São registrados cerca de 1 milhão de novos casos por ano mundialmente. O último dado registrado em 2022 é que aproximadamente 242 mil indivíduos foram a óbito pelas formas mais graves de evolução da hepatite C, sendo elas cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) (WHO, 2024).

No Brasil, de acordo com o último Boletim Epidemiológico disponibilizado pelo Ministério da Saúde, entre 2000 e 2023 foram registrados 318.316 casos confirmados de hepatite C. A região com maior taxa de detecção de RNA positivo para HCV foi a Sudeste, com cerca de 58,1%, seguido da região Sul com 27,1% dos casos. No Nordeste, foram registrados 7,2% dos casos, 3,9% no Centro-Oeste e 3,7% no Norte (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE HEPATITES VIRAIS, 2024). Entretanto, a abrangência da triagem e o acesso aos tratamentos permanecem desiguais em diferentes regiões brasileiras, apresentando variações que ilustram a desigualdade socioeconômica existente no país. Áreas mais favorecidas, como a região Sudeste, conseguem acessar diagnóstico e tratamento com mais facilidade, enquanto regiões menos privilegiadas, como o Norte e o Nordeste, encontram dificuldades maiores relacionadas à logística e à infraestrutura (FERREIRA, 2023).

Seguindo o perfil mundial, os genótipos mais prevalentes no Brasil são o 1 seguido do 3. Aproximadamente 40,9% dos indivíduos são infectados pelo subtipo 1a, seguido do subtipo 1b com 30,2% dos casos. Em terceiro lugar, o genótipo 3 é encontrado em cerca de 23,8% da população infectada com HCV.

A prevalência dos outros genótipos no Brasil é menor do que 4% (MESSINA *et al.*, 2015).

A hepatite C é a maior causa de morte entre as hepatites virais, com cerca de 68.189 óbitos associados a essa doença. Em 2022, o coeficiente de mortalidade no país foi de 0,5 óbito por 100 mil habitantes (BRASIL, BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE HEPATITES VIRAIS, 2024) (**Figura 3**). Desde 2015, quando foi implementado no Brasil o tratamento com os antivirais de ação direta (DAAs, do inglês *direct-acting antivirals*), que tem alta taxa de resposta terapêutica, houve uma queda no índice de mortalidade (REZENDE, 2021).

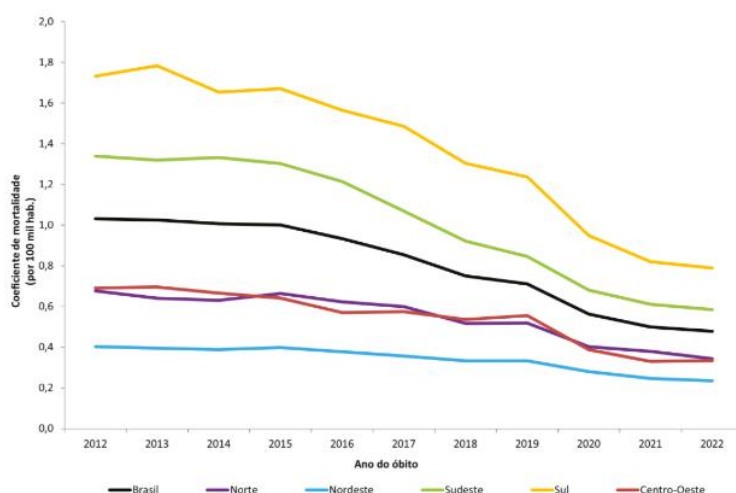


Figura 3: Coeficiente de mortalidade por hepatite C no Brasil entre 2012 e 2022. O maior coeficiente de mortalidade por hepatite C foi registrado na região Sul (em amarelo) e o menor registrado no Nordeste do país (em azul). Fonte: Brasil, Boletim epidemiológico de hepatites virais, 2024, SIM/SVSA/MS, IBGE 2024.

1.3 O ciclo infeccioso do vírus da hepatite C

O HCV infecta principalmente as células hepáticas e pode invadir os hepatócitos de duas maneiras: transmissão célula-célula e transmissão livre de contato. A invasão do HCV depende de interações entre componentes do metabolismo lipídico do hospedeiro e fatores virais (LI *et al.*, 2021). Assim que o vírus entra no organismo do hospedeiro, forma-se uma partícula lipoviral (LVP) com as lipoproteínas de muito baixa densidade e baixa densidade (VLDL e LDL), apolipoproteínas (APOs), ésteres de colesterol e triglicerídeos do indivíduo (**Figura 4**).

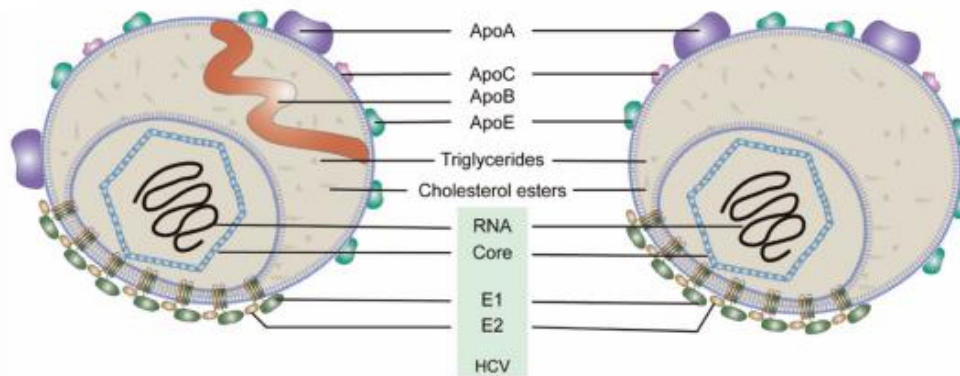


Figura 4: Formação da partícula lipoviral entre o HCV e componentes do metabolismo lipídico do hospedeiro. Composição de um vírion maduro: VLDL e as Apos associadas ao HCV. Fonte: Adaptado de Li *et al.*, 2021.

A partir daí a partícula se adere à membrana dos hepatócitos com o auxílio de proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPGs) e receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR). Ao mesmo tempo, as glicoproteínas do envelope viral E1 e E2 interagem com os receptores *Scavenger Receptor class B type 1* (SRB1) e de CD81 (proteína tetraspanina), permitindo a fixação da partícula à célula hepática. Enquanto isso, as claudinas 1, 6 e 9, ocludina, receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e receptor de efrina tipo A2 (EphA2) auxiliam na endocitose mediada por clatrina, permitindo a entrada do endossomo na célula (MANNS *et al.*, 2017).

Por conseguinte, a vesícula fica dispersa no citosol e o pH ácido dentro do endossomo permite a fusão entre as membranas, fazendo com que o capsídeo viral se rompa e libere o material genético para a próxima etapa (TSCHERNE *et al.*, 2006; MIAO *et al.*, 2017). Uma vez no citosol, o RNA é utilizado para replicação e tradução proteica. A tradução ocorre nos ribossomos aderidos ao RE e é iniciada a partir da ligação ao IRES do 5' NTR. Ocorre o processamento da poliproteína e a clivagem das proteínas estruturais e não estruturais do HCV, dentre essas, a NS5B, que possibilita a replicação do RNA. O RNA de polaridade negativa, recém-sintetizado, age como molde para a síntese de inúmeras novas fitas de RNA positivo em uma região chamada teia membranosa (*membranous web*). O microRNA-122 (miR-122) ajuda na manutenção do RNA viral, não permitindo que seja degradado por exonucleases (MANNS *et al.*, 2017).

A montagem do vírion consiste em diversas etapas não totalmente elucidadas e ocorre no RE próximo a gotículas de lipídio (*lipid droplets*). O RNA, quando liberado do núcleo, é transportado para o local de montagem do

nucleocapsídeo e encapsulado. O nucleocapsídeo, já com o RNA viral dentro, é envolvido pelo lúmen do RE e se associa com as proteínas do envelope, formando um vírion ainda imaturo. O vírion segue em direção ao complexo de Golgi e finaliza sua maturação, se fundindo a VLDL e pronto para ser liberado. A LVP madura se funde a membrana celular do hepatócito, sendo liberada pelo processo de exocitose e circula para outros tecidos através da corrente sanguínea (**Figura 5**) (MOROZOV & LAGAYE, 2018; HEPATITIS C ONLINE, 2024).

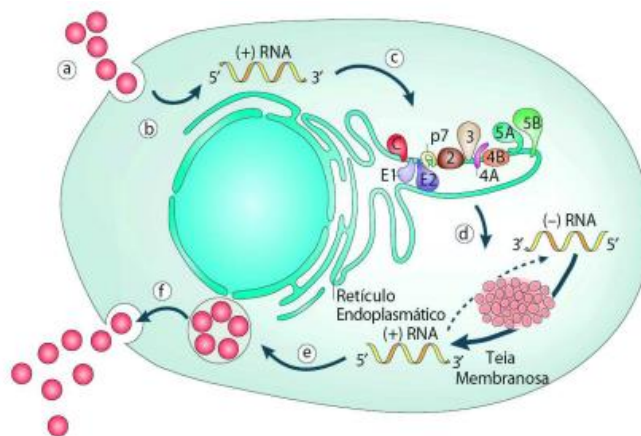


Figura 5: Ciclo infeccioso do HCV. (a) Entrada do vírion nas células hepáticas; (b) Liberação do RNA viral no citoplasma; (c) Tradução e processamento da poliproteína; (d) Replicação do material genético viral; (e) Empacotamento do RNA e montagem do vírion; (f) Maturação e liberação da partícula lipoviral (LVP). Fonte: Brasil, Manual técnico para diagnóstico de hepatites virais, 2018; adaptado de Moradpour; Penin; Rice, 2007.

1.4 História natural da infecção pelo vírus da hepatite C

A hepatite C é um importante problema de saúde pública, visto que a sua infecção tende a ser persistente no hospedeiro. Geralmente é uma doença de caráter silencioso, apresentando ou não sintomas muito inespecíficos, tais como letargia, mal-estar geral, febre, náuseas e perda de apetite (BIOMANGUINHOS-FIOCRUZ, 2022). Desta forma, o portador muitas vezes não procura o serviço de saúde para verificar a causa, favorecendo o pior prognóstico hepático em longo prazo (KOHARA, 2000).

A hepatite C aguda é caracterizada pela inflamação do fígado pelo HCV e representa o estágio inicial da infecção, sendo esses seis meses após a primeira exposição ao vírus. Essa fase configura a probabilidade de eliminação viral espontânea (*clearance viral*) (FASANO *et al.*, 2024). A partir do momento

que o organismo se torna incapaz de eliminar o vírus por conta própria, este se torna persistente e a infecção se torna crônica (CHIGBU *et al.*, 2019).

O desenvolvimento do CHC é uma das principais complicações associadas à infecção pelo vírus, cuja evolução para quadros mais graves ocorre de maneira gradual. Cerca de 70% (55% - 85%) dos indivíduos infectados pelo HCV evolui para a forma crônica da doença e os outros 15 a 20% apresentam cura espontânea. Os pacientes com hepatite C crônica têm 15% a 30% de chance de evoluir em um período de em torno de 20 anos para cirrose, estágio final da fibrose, que ocorre devido à cicatrização das lesões hepáticas que o HCV causa (WHO, 2024) (**Figura 6**). As proteínas virais podem atuar como sinalizadoras para inibição dos genes supressores de tumor e alterar os pontos de controle do ciclo celular. Dessa forma, aumentando a proliferação exacerbada de células e propiciando a formação de um tumor em 1 a 4% dos casos ao ano. (LUNA-CUADROS, 2022; WHO, 2024).

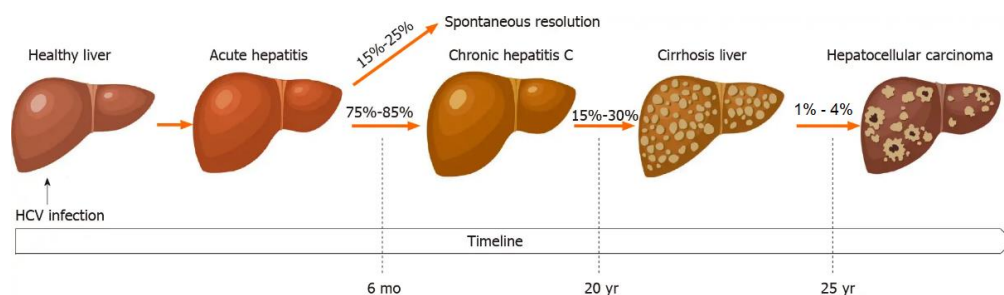


Figura 6: História natural da infecção pelo HCV. São mostradas etapas progressivas de hepatite aguda, hepatite crônica, cirrose e CHC ao longo dos anos. Fonte: Adaptado de Luna-Cuadros, 2022.

Vários são os fatores que influenciam na progressão da doença hepática causada pela infecção crônica pelo HCV, no entanto, estes eventos ainda não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se que se trata de uma complexa interação entre fatores do hospedeiro e do vírus (DUSTIN *et al.*, 2016).

A esteatose hepática é muito comum em indivíduos com HCV, observada principalmente em pacientes infectados pelo genótipo 3. A esteatose contribui para o surgimento de lesões hepáticas, podendo piorar o prognóstico do indivíduo. O genótipo 3 do HCV tem sido associado à rápida progressão para fibrose. Já o genótipo 1 está mais associado ao aumento de resistência insulínica, menor resposta ao tratamento e maior risco de desenvolvimento de cirrose e CHC (PRECIADO *et al.*, 2014). Além do genótipo viral, fatores do hospedeiro como idade, sexo e consumo de álcool já foram associados à

progressão da doença hepática na hepatite C crônica (HUTCHINSON *et al.*, 2005; POYNARD *et al.*, 1997).

1.5 Formas de transmissão do HCV e diagnóstico da hepatite C

O HCV era responsável por 90% dos casos de hepatites pós transfusionais. Sendo assim, todas as pessoas que receberam transfusão de sangue até o início dos anos 90, com ou sem histórico de hepatite, devem ser avaliadas para uma provável infecção. No Brasil, tornou-se obrigatoriedade que a partir de 1993 candidatos a doadores de sangue devessem passar por teste sorológico anti-HCV (STRAUSS, 2001). Dessa forma, o risco de contaminação por HCV via transfusão de sangue diminuiu, no entanto, ainda há outras maneiras importantes que permitem a disseminação da doença (CDC, 2024).

O compartilhamento de seringas durante o uso de drogas injetáveis é atualmente a forma mais comum da infecção pelo HCV, correspondendo a cerca de 80% dos casos. Contudo, ainda existem outras vias passíveis de transmissão viral, bem como a relação sexual sem o uso de preservativos. O HCV pode permanecer viável por até seis semanas em superfícies contaminadas. Dessa forma, equipamentos médicos, odontológicos e de manicures, quando mal esterilizados, podem transmitir o vírus (WOYESA & AMENTE, 2023). A transmissão de mãe para filho também é uma possibilidade de infecção, podendo ocorrer principalmente na hora do parto. Acredita-se que isso aconteça pela ruptura prolongada de membranas e pela carga viral elevada durante a gravidez (ELWOOD *et al.*, 2019).

Como já dito anteriormente, a hepatite C é uma doença silenciosa e geralmente não apresenta sintomas ou apresenta sintomas inespecíficos. Sendo assim, o Centro de Controle de Prevenção de Doenças (CDC, do inglês *Center for Diseases Control*) recomenda que todos os indivíduos, principalmente gestantes, que eventualmente possam ter sido expostos ao vírus, sejam testados e comecem o tratamento o mais rápido possível (CDC, 2024).

O teste inicial para rastreio e diagnóstico recomendado a nível mundial é o ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-HCV (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). É importante também verificar

os níveis séricos de marcadores hepáticos, como a alanina transaminase (ALT) que é um marcador de lesão hepática. A partir daí o paciente é encaminhado para o teste molecular, como a PCR em tempo real (qPCR), que detecta e quantifica o RNA viral a partir do soro ou do plasma e confirma infecção ativa. É feita então a avaliação histopatológica e pontuação de acordo com a gravidade da lesão hepática (MUKHERJEE *et al.*, 2015).

Atualmente já existem ferramentas mais rápidas de diagnóstico de diversas doenças infecciosas disponíveis no sistema básico de saúde. O teste rápido (TR) (imunocromatografia de fluxo lateral) (**Figura 7**) é uma maneira inicial de verificar se o indivíduo que está com suspeita de infecção possui anticorpos contra o HCV. Caso o paciente estiver positivo para o anti-HCV, precisa da confirmação molecular. Ao obter o diagnóstico positivo, o paciente é encaminhado para verificar o quanto o fígado está comprometido. Antigamente utilizava-se biópsia hepática que, por mais que seja considerada padrão não é mais usada na rotina, pois além de ser caro, é extremamente invasiva e pode gerar complicações. Atualmente o FibroScan® é a técnica mais utilizada para verificar o grau de fibrose (LI *et al.*, 2020).

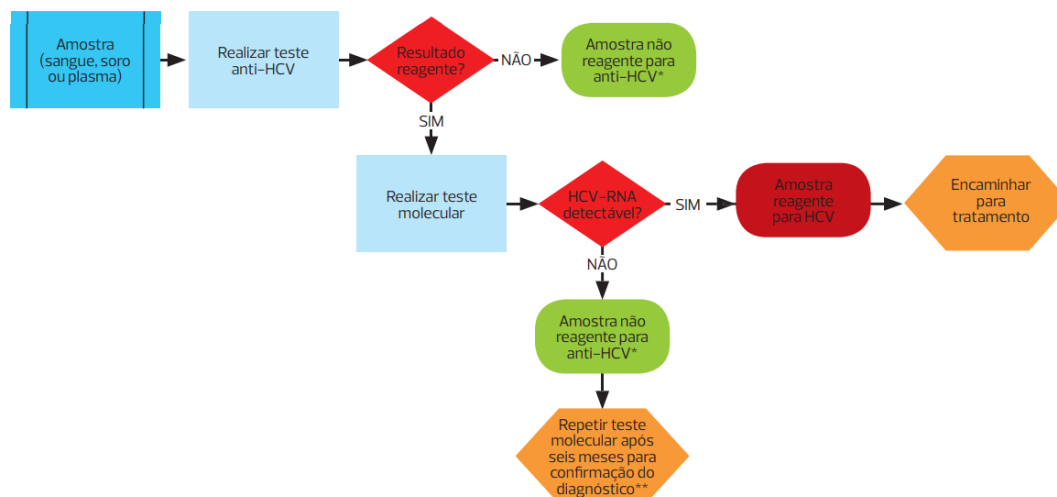


Figura 7: Fluxograma da investigação inicial utilizando teste rápido anti-HCV. TR: Teste rápido. Fonte: Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite C e coinfeções, Ministério da Saúde, 2019.

1.6 Tratamento da hepatite C

O tratamento para hepatite C até meados de 1990 era realizado com interferon (IFN), que é uma citocina imunomoduladora secretada por diferentes tipos de células em resposta a infecções virais, particularmente por leucócitos. O IFN-alfa foi por muito tempo, em torno de 14 anos, o único tratamento aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), EUA, em posologia de administração por três vezes por semana. No entanto, apenas 5 a 20% dos pacientes respondiam de forma sustentada ao tratamento (ALVES *et al.*, 2003), ou seja, permaneciam com níveis de RNA-HCV indetectáveis mesmo após a suspensão da terapia antiviral.

Em 1998 foram publicados dois trabalhos que comparavam os resultados do uso isolado de IFN-alfa e quando combinado com ribavirina (RBV), um análogo de nucleosídeo. Foi demonstrado que a associação de IFN e RBV aumentava a taxa de resposta viral sustentada (RVS) em pacientes após 24 semanas (ALVES *et al.*, 2003). A partir disto, as diretrizes do NIH (*National Institutes of Health*) em março de 1999 recomendaram essa terapia para pacientes entre 18 e 60 anos com níveis elevados de ALT e RNA HCV detectável no soro (SATOOR & RAUFMAN, 2001). A partir de 2001, passou a ser utilizado também o IFN-alfa conjugado a uma molécula de polietilenoglicol (PEG), o PEG-IFN (IFN peguado), que aumentou a taxa de meia vida do medicamento possibilitando ser administrado de maneira subcutânea uma vez por semana (ÁVILA *et al.*, 2006). Esta última forma de tratamento aumentou a taxa de resposta para em torno de 45% (ACRAS *et al.*, 2004).

Entretanto, o uso deste tratamento de maneira contínua pode causar uma série de efeitos adversos no indivíduo como: dor de cabeça, fadiga, febre, tontura e náuseas. Dentre esses, outros mais graves como depressão, ansiedade, anemia, plaquetopenia e neutrofilia (SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE MATO GROSSO DO SUL, 2015).

Em 2011 iniciou-se a era do uso de DAAs para o tratamento de pacientes com hepatite C crônica. Nesse momento, a biologia do vírus já era mais bem compreendida e os DAAs interferem diretamente nas proteínas virais chaves para replicação. Porém, apenas o uso desta nova terapia logo induziu resistência. Dessa forma, passou a ser utilizada a terapia tripla (PEG-IFN + RBV + inibidor de protease), que aumentou as taxas de resposta virológica sustentada (RVS) para em torno de 70%. Entretanto, apresentava eficácia

apenas em indivíduos com HCV do genótipo 1 e o paciente ainda estava submetido aos efeitos adversos do INF e da RBV (ARTMED, 2024).

Em 2013 novos DAAs surgiram com propriedades pangenotípicas (**Figura 8**) os quais apresentaram uma menor taxa de efeitos adversos e, também, elevaram as taxas de RVS para próximo de 99%. Com isso, criou-se o seguinte cenário: terapias com duração menor de 8 a 12 semanas, podendo ser administrado em todas as situações clínicas e sem o uso de INF (chamada era livre de IFN) (GONZALEZ *et al.*, 2016; POL & LAGAYE, 2019).

No Brasil, a terapia disponibilizada até 2012 para pacientes portadores de hepatite C era PEG-INF e RBV (PCDT, 2011). Entretanto, em 2013 foi aprovado pelo Ministério da Saúde o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) com a inclusão de inibidores de protease que, juntamente ao esquema anterior, formavam a terapia tripla. Apenas no final de 2015 o Ministério da Saúde aprovou o PCDT em que foi incluído o uso dos DAAs com objetivo de erradicação do agente infeccioso por meio da combinação de 3 medicamentos. Os antigos inibidores foram retirados da rede pública (CURSINO & ELIAS, 2019).

Em 2022 houve uma maior disponibilização de DAAs com ação pangenotípica. Desta forma, o Ministério da Saúde está dispensando a genotipagem na maioria dos pacientes. Atualmente, a genotipagem só está sendo feita para pacientes que tiveram falha terapêutica, ou seja, aqueles que não responderam ao tratamento e precisam mudar de tratamento ou para crianças entre 3 e 11 anos (ARTMED, 2024).

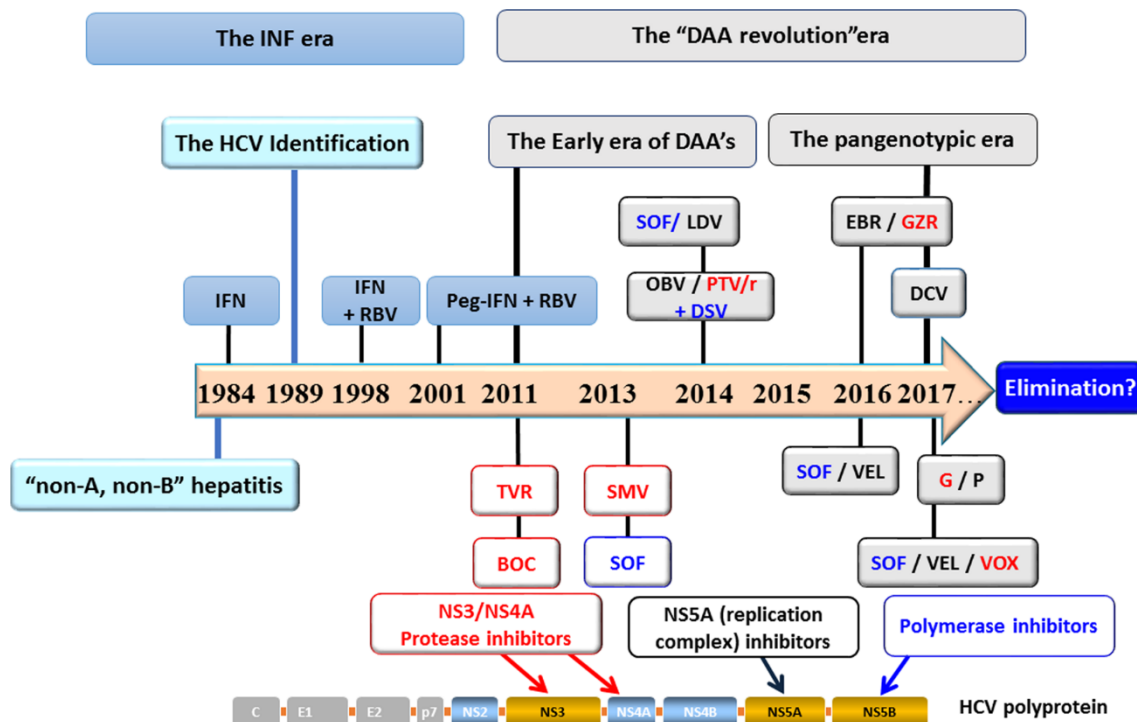


Figura 8: Histórico do tratamento para hepatite C ao longo dos anos. BOC = Boceprevir; DAA = antiviral de ação direta; DCV = Daclastavir; DSV = Desabuvir; EBR = Elbasvir; GZR = Grazoprevir; HCV = vírus da hepatite C; INF = Interferon; LDV = Ledipasvir; NS = não estrutural; OBV = Ombitasvir; PTV/r = Paritaprevir com ritonavir; P = Pibrentasvir; PEG-IFN = Interferon peguilado; RBV = Ribavirina; SMV = Simeprevir; SOF = Sofosbuvir; TVR = Telaprevir; VEL= Velpatasvir; VOX = Voxilaprevir. Fonte: Pol & Lagaye, 2019.

1.7 Interação do HCV com metabolismo lipídico

Como já dito anteriormente, a infecção pelo HCV depende do metabolismo lipídico do hospedeiro (POPESCU *et al.*, 2014). Os lipídeos englobam diversas macromoléculas como ácidos graxos, colesterol e triglicerídeos. Os triglicerídeos são insolúveis em água, porém, ainda sim são transportados pela corrente sanguínea, isso porque o fígado e o intestino têm a capacidade de montar e segregar emulsões lipido-proteicas, conhecidas como lipoproteínas. (BASSEDINE *et al.*, 2013).

As lipoproteínas plasmáticas são partículas pseudomicelares divididas em várias classes com base na sua densidade e pela composição tanto lipídica quanto proteica, são elas: quilomicrons (QM), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (DING *et al.*, 2022). As apolipoproteínas (APOs) correspondem à porção proteica da lipoproteína e são componentes chave da estrutura das

lipoproteínas essenciais para a estabilidade, reconhecimento dos receptores e regulação metabólica (MA *et al.*, 2024). Até o momento, a função melhor estabelecida é seu envolvimento no transporte e redistribuição de lipídeos nos tecidos (MAHLEY, 1984).

O acúmulo de lipídeos no fígado, como colesterol e triglicerídeos, gera um desequilíbrio metabólico. As proteínas virais alteram a lipogênese, promovendo uma maior síntese de lipídeos e maior formação de lipoproteínas que favorecem a montagem da partícula viral e sua propagação (LESLIE, 2022).

O HCV tem uma característica marcante de associação com as lipoproteínas. Principalmente com a VLDL e LDL através da afinidade entre as proteínas de superfície do vírus e as APOs, principalmente a apolipoproteína B (APOB) e apolipoproteína E (APOE), formando as partículas lipovirais (LVPs) (**figura 9**) (CROUCHET *et al.*, 2017). A APOE é amplamente distribuída entre a superfície da partícula lipoviral e já foi associada à ligação inicial entre o vírus e a célula hospedeira. Outra apolipoproteína, a APOC1 também já foi relacionada ao aumento da infecciosidade viral pelo HCV, sua atividade pode influenciar a etapa de fusão dependente do pH (LAVIE & DUBUISSON, 2017). Consequentemente, as LVPs compartilham propriedades biofísicas com as VLDL através da sua ligação com as APOs. O HCV se utiliza disso como estratégia para uma propagação eficiente nos hepatócitos (WRENSCH *et al.*, 2018).

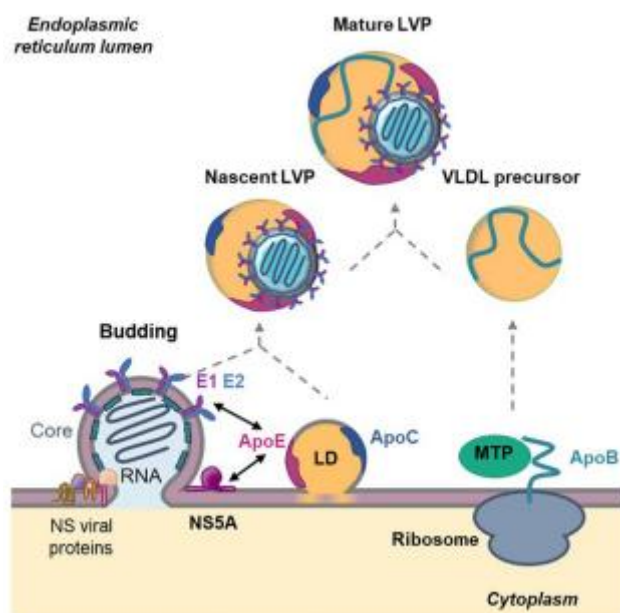


Figura 9: Papel das APOs na morfogênese da LVP do HCV. Formação da LVP no retículo endoplasmático (RE) próximo a gotículas lipídicas (LD). O RNA viral juntamente ao core se unem e formam o nucleocapsídeo, onde as glicoproteínas E1 e E2 estão ancoradas a membrana e juntamente a APOE e APOC auxiliam na montagem de uma LVP nascente. Ao mesmo modo que a APOB está recebendo lipídeos da proteína de transferência de triglicerídeos microsossomal (MTP) e se junta a LVP nascente, formando uma partícula madura. Fonte: Wrensch *et al.*, 2018.

1.7.1 Apolipoproteína B

Apolipoproteína B (APOB) é uma das principais APOs, secretada pelo fígado como um componente da superfície externa das partículas de VLDL e LDL (HARADA *et al.*, 2018). A APOB é codificada por um gene de 29 exons e 28 íntrons em sua estrutura, localizado no cromossomo 2 (ACEVES-RAMÍREZ *et al.*, 2022). No metabolismo lipídico a APOB está envolvida no transporte de triglicerídeos e colesterol, além de auxiliar na formação da LVP (WRENSCH *et al.*, 2018).

O grau de participação da APOB no ciclo infeccioso do HCV ainda não é bem definido. Estudos demonstraram que o receptor *scavenger* classe B tipo I (SR-BI), que é o principal receptor relacionado à entrada do HCV, é mediada por APOB e APOE, sugerindo que elas sejam importantes para a montagem da LVP (DAO THI *et al.*, 2012). À medida que ocorre a maturação e liberação do HCV, a APOB recebe lipídios através da proteína de transferência de triglicerídeos microsossomal (MTP) para gerar VLDL e associar-se com a partícula recém liberada, formando a LVP (figura 9) (WRENSCH *et al.*, 2018).

1.7.2 Apolipoproteína A1

A APOA1 é um polipeptídeo de 243 aminoácidos identificada há 50 anos com papel fundamental na conservação da integridade da HDL, responsável pelo transporte reverso de colesterol, remover os excedentes dos tecidos e transportá-los até o fígado (CASTRO *et al.*, 2019; COCHRAN *et al.*, 2021).

A APOA1 já foi relacionada a baixos níveis de RNA viral em pacientes infectados e já foi descrito que a APOA1 está incorporada na partícula viral, mas ainda não se sabe ao certo qual a sua função (BRIDGE, 2018).

O ciclo infeccioso do HCV altera o metabolismo lipídico do hospedeiro, favorecendo a replicação viral e a produção de vírions. O aumento da biossíntese de colesterol e ácidos graxos gera um acúmulo de lipídios nos hepatócitos, contribuindo para a esteatose hepática que, em longo prazo, pode acarretar problemas cardiovasculares e resistência insulínica (NEGRO *et al.*, 2014; CARUZ *et al.*, 2014). A infecção pelo HCV pode influenciar o desenvolvimento de alterações fisiológicas que acarretam doenças secundárias envolvidas no metabolismo lipídico, como doenças cardiovasculares. A APOA1 foi associada a impactos positivos nessas patologias. Ela foi vista como uma proteína cardioprotetora principalmente contra aterosclerose, auxiliando na diminuição da inflamação nas células endoteliais. Além disso, recentemente foi visto que o aumento de HDL bem como a APOA1 auxilia no controle glicêmico em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (COCHRAN *et al.*, 2021).

1.7.3 Receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR)

LDLR é uma proteína transmembrana de superfície celular envolvida na endocitose mediada por receptor de ligantes específicos. A proteína codificada é normalmente ligada à membrana celular do hepatócito, onde se liga à LDL e é levada para dentro da célula (NIH, 2024). LDLR é proposto como um receptor de entrada do HCV, entretanto, ainda há uma divergência entre a real função desse receptor como um facilitador para a propagação viral (SYED, 2014; GRASSI, 2016).

As partículas de VLDL são liberadas pelo fígado e vão diretamente para a corrente sanguínea, são hidrolisadas até LDL e reabsorvidas pelos hepatócitos através da LDLR (CHAPPELL & MEDH, 1998). Alguns estudos anteriores relacionaram a prevalência de hipo-beta-lipoproteinemia e hipocolesterolemia em

pacientes infectados pelo HCV, sugerindo uma maior absorção de lipoproteínas séricas pelos hepatócitos em indivíduos infectados (SYED, 2014).

1.8 Polimorfismos de Nucleotídeo Único

O genoma humano consiste em torno de três bilhões de pares de bases (pb). Manteve-se bem conservado durante a evolução, cerca de 99,5% idêntico entre todos os humanos da face da terra (KARKI *et al.*, 2015). Porém, muitos genes possuem variações nas sequências do genoma humano. Geralmente, a forma mais comum da sequência é chamada de alelo selvagem e o mais incomum é denominado alelo mutante. As existências de muitos sítios de polimorfismos podem ser responsáveis por diferentes variantes nas proteínas codificadas, podendo ou não alterar a função e atividade dessa proteína (ARAÚJO *et al.*, 2009).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP – do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) (**figura 10**) são variações genéticas em sequências de DNA, as quais ocorre a substituição de apenas um nucleotídeo, que pode ocorrer devido a uma falha da replicação do material genético (GUIMARÃES, 2020). SNP é um tipo de variante de nucleotídeo único (SNV – do inglês *Single Nucleotide Variant*). Os SNPs ocorrem em mais de 1% da população, o SNV é a variação em si, podendo ocorrer em menos de 1% da população. Os SNPs podem ocorrer em sequências codificantes, íntrons e em regiões intergênicas, podendo ser utilizados como assinaturas genéticas na população e que permitem estudar determinadas características incluindo doenças (KARKI *et al.*, 2015).

Os SNPs podem influenciar na leitura da fita de RNA mensageiro (RNAm) pelo ribossomo e prejudicar a produção de uma proteína através de algumas formas. Quando esse polimorfismo está em uma região codificante, a troca de uma base nitrogenada pode desencadear a mudança de um aminoácido codificado ou gerar um códon de parada que interrompe a leitura gerando uma proteína não funcional (SNP não sinônimo). Essa troca de base também pode não gerar nenhum prejuízo para a proteína e não incorrer nenhuma mudança no aminoácido (SNP sinônimo). Esses SNPs ocorrem em cerca de 1 a cada 1000 pb do genoma humano (GUIMARÃES, 2020; KARKI *et al.*, 2015).

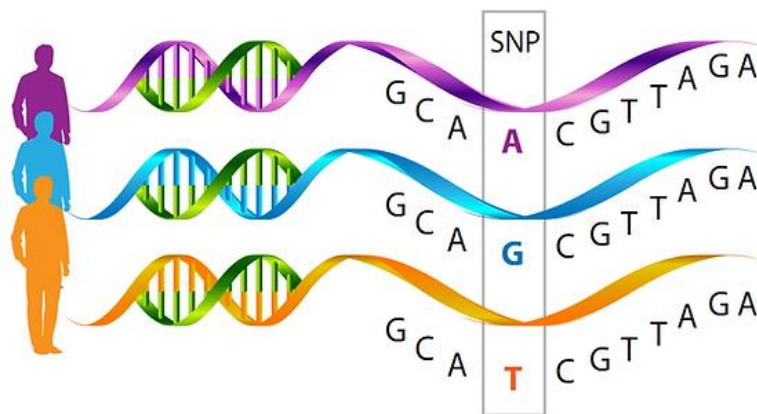


Figura 10: Representação esquemática de SNP. Três possibilidades de nucleotídeo em um sítio do genoma. Fonte: Nutrigenetics Specialists, 2017.

1.8.1 Nucleotídeos de Polimorfismo Único no metabolismo lipídico

O estudo de SNPs vem sendo associado a várias patologias ao longo dos anos, sendo que já foram vistas alterações em diversos genes que influenciam como aquele indivíduo vai responder à determinada doença. Como exemplos, polimorfismos em Metaloproteinase de Matriz 1 (MMP1) já foram associadas ao câncer de pulmão, polimorfismos em Sintaxina 1A (STX1A) já foram associados à DM2 e polimorfismos na lipase já foram relacionados a dislipidemias (SHASTRY, 2007).

Vem sendo observado que SNPs em apolipoproteínas ou nos receptores lipídicos estão associados à infecção pelo HCV (WRENSCH *et al.*, 2018). SNP na posição rs5925 do gene LDLR já foi associado à maior susceptibilidade da infecção pelo HCV (Li *et al.*, 2006). Em APOB, polimorfismos no rs1042034 também foram associados à susceptibilidade do HCV (HARADA *et al.*, 2018). Já o rs676210 foi associado a oxidação de LDL e níveis séricos de lipídeos mais elevados (ACEVES-RAMÍREZ *et al.*, 2022). O estudo de associação do genoma (GWAS, do inglês *Genome-Wide Association Studies*) identificou que SNP em APOA1 rs964184 está associado a níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol e LDL-colesterol (QIU *et al.*, 2018). No entanto, ainda não há estudos sobre a associação de APOA1 rs964184 com a infecção pelo HCV. Este SNP faz parte de um *cluster* gênico denominado APOA1/C3/A4/A5-ZPR1-BUD13 localizado no cromossomo 11 (**figura 11**) e se refere: as APOs, ao ZPR1 (proteína dedo de zinco) que codifica uma proteína reguladora envolvida na proliferação

celular e na transdução de sinais, e ao BUD13, um dos fatores relacionados ao *splicing* a retenção do pré-mRNA nuclear. SNPs neste *cluster* gênico tem sido associado com contribuintes para dislipidemia. (BAI *et al.*, 2019). Dessa forma, iremos nos referir a esse SNP como APOA1 rs964184 que é como ele é encontrado na literatura quando relacionado a alterações lipídicas.

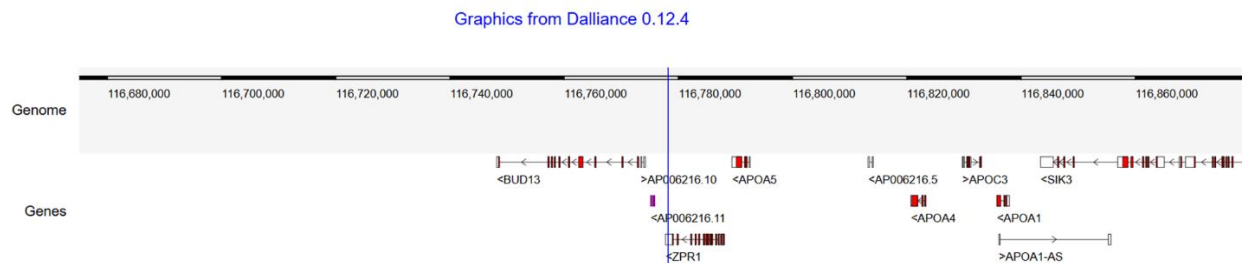


Figura 11: Cluster gênico onde está localizado APOA1. ApoA: Apolipoproteína A; ApoC: Apolipoproteína C; ZRP1: Proteína dedo de zinco; BUD13: Bud13 homólogo. Fonte: Adaptado de: <https://opensnp.org/snps/rs964184>

Outras variantes também são associadas à infecção pelo HCV como a APOE, que possui três isoformas de acordo com os genótipos em rs7412 e rs429358. A isoforma E2 de APOE tem sido associada à resposta ao tratamento e ao desenvolvimento de fibrose (CHIBA – FALEK *et al.*, 2012). Polimorfismos na interleucina 28B (IL28B) foram associados a pacientes que tiveram RVS em tratamento com PEG-INF/RBV. Foi visto que indivíduos que carregam o genótipo CC em rs12979860 possuem maiores taxas de RVS (LIN *et al.*, 2011).

Desta forma, SNPs em genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo lipídico devem ser mais bem estudadas na infecção crônica pelo HCV, pois podem ser úteis como marcadores de prognóstico, visto que parâmetros biológicos que ditam um estado particular de um organismo são candidatos a um biomarcador (ZAMORA-OBANDO *et al.*, 2022).

2. Justificativa

A infecção pelo HCV apresenta uma alta taxa de cronificação (em torno de 70% dos casos). Esse quadro clínico apresenta etapas progressivas de doença hepática com desenvolvimento de fibrose, cirrose e CHC ao longo dos anos, e por ser uma doença silenciosa, normalmente o diagnóstico é feito de forma tardia. Além disso, o HCV é a etiologia mais associada ao CHC, acometendo principalmente aqueles que evoluíram para cirrose, com importante taxa de mortalidade e indicação para o transplante de fígado. O grau e a velocidade de evolução da doença hepática variam entre os indivíduos com hepatite C crônica e dependem de diversos fatores, não só relacionados à infecção viral, mas também a condições do sistema imunológico, ambientais e genéticos do hospedeiro.

Alterações metabólicas como esteatose, resistência à insulina e DM2 parecem acelerar o progresso para quadros mais avançados de doença hepática. Nesse contexto, apolipoproteínas e lipoproteínas possuem importante papel no metabolismo lipídico do hospedeiro, além de ficarem associadas à partícula viral, auxiliando na sua montagem e propagação, facilitam o seu escape do sistema imune.

É importante estudar as associações entre os polimorfismos em APOB rs1042034, APOA rs964184 e LDLR rs5925 e as características clínicas e laboratoriais de pacientes com hepatite C crônica para tentar entender o quanto essas variações podem influenciar na gravidade da infecção. É fundamental a inclusão de estudos brasileiros para que possamos acrescentar o conhecimento quanto à genética e a ancestralidade de diferentes populações mundiais, bem como a sua evolução e o quanto interfere nos indivíduos atualmente. Essas variantes são associadas tanto ao HCV quanto a doenças correlacionadas que podem prejudicar a qualidade de vida do paciente infectado. Porém, ainda há escassez de estudos correlacionando polimorfismos em apolipoproteínas e receptores de lipoproteínas na hepatite C.

O estudo concomitante de características clínico-laboratoriais como o perfil metabólico e de polimorfismos gênicos em marcadores do metabolismo lipídico de pacientes com hepatite C crônica permite avaliar se os grupos que responderam ou não ao tratamento e que progrediram para estágios menos ou mais avançados de doença hepática apresentam características comuns entre si.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o papel dos SNPs em APOA1 rs964184, APOB rs1042034 e rs676210 e LDLR rs5925 e suas associações com diferentes desfechos clínicos em pacientes com hepatite C crônica.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar retrospectivamente a evolução clínica de pacientes com hepatite C crônica com longo acompanhamento clínico;
- Categorizar os pacientes com hepatite C crônica de acordo com características demográficas, clínicas e laboratoriais;
- Identificar a frequência genotípica e alélica em APOA1 rs964184, APOB rs1042034 e rs676210 e LDLR rs5925 na população de estudo;
- Associar os respectivos polimorfismos em APOB, APOA1 e LDLR com características metabólicas e condições patológicas associadas dos pacientes;
- Investigar o potencial dos genótipos de APOA1 rs964184, APOB rs1042034 e rs676210 e LDLR rs5925 como biomarcadores de prognóstico em pacientes com hepatite C crônica.

4. Metodologia

4.1 População de estudo e coleta de amostras

O presente estudo foi de caráter retrospectivo e incluiu 109 pacientes do Serviço de Hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF-UFRJ). Todos os indivíduos incluídos eram maiores de 18 anos, diagnosticados com hepatite C crônica, com RNA-HCV detectado no soro. Tivemos como critérios de exclusão: pacientes grávidas ou amamentando; fazendo uso de imunossupressores ou co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e/ou o HBV.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUCFF-UFRJ: CEP-166/05 e CIC 148/05 (**Anexo 1**); e 1.396.987 (**Anexo 2**).

Os pacientes estavam infectados pelos subtipos 1a, 1b e 3a do HCV e foram tratados por seis meses com IFN α e RBV quando infectados com HCV-3a e por 12 meses com PEG-IFN α e RBV quando infectados com HCV-1a ou HCV-1b. Esses pacientes foram acompanhados clinicamente no HUCFF-UFRJ por cerca de 10 anos desde a detecção da doença. Dessa forma, foram obtidas as características clínicas dos pacientes, bem como comorbidades já existentes que podem agravar o estado do indivíduo.

Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais de cada paciente foram obtidos através de prontuários médicos ou avaliados utilizando kits específicos. O grau de fibrose, que é uma importante característica de pacientes com hepatite C, foi determinado por biópsia hepática ou elastografia hepática transitória (Fibroscan®), que é um método não invasivo para medir o grau de rigidez hepática. Foi utilizada a escala METAVIR (*Meta-analysis of Histological Data in Viral Hepatitis*) (BEDOSSA & PONARD, 1996), onde: F0 - paciente sem fibrose, F1- com fibrose leve, F2 – com fibrose moderada, F3 - com fibrose avançada e F4 - paciente com fibrose avançada e cirrose para categorizar/classificar os pacientes do estudo. Dos 109 pacientes incluídos no estudo, 71 apresentavam dados de fibrose hepática no pré-tratamento, enquanto 38 também apresentavam dados de fibrose hepática no pós-tratamento. Os pacientes foram agrupados em duas categorias, sendo elas: doença leve (fibrose leve/moderada) pacientes com a classificação METAVIR F1 e F2 e doença grave

(fibrose avançada/cirrose) pacientes F3 e F4. Pacientes com dado de fibrose tanto no pré quanto no pós-tratamento tiveram a progressão da doença hepática avaliada.

Ao longo do tratamento os pacientes foram monitorados através da avaliação dos níveis virais circulantes no soro (carga viral). Foram monitorados 48hs após início do tratamento, 7 dias, 30 dias, 90 dias, 180 dias (final do tratamento para pacientes infectados com HCV-3a) e 365 dias (final do tratamento de pacientes com HCV-1a ou HCV-1b). Para avaliar a RVS, era coletado sangue dos pacientes 6 meses após o término do tratamento. Assim, os pacientes foram agrupados de acordo com a forma com que responderam ao tratamento, sendo elas: (1) respondedores virológicos sustentados (RVS), que são aqueles que após 180 dias do fim do tratamento não apresentavam HCV-RNA detectado em seu soro (n=33); (2) recidivantes (REC), que são aqueles em que a carga viral é reduzida ao longo do tratamento, chegando a não ser detectado ao fim do tratamento, entretanto, 180 dias após o fim do tratamento o RNA-HCV volta a ser detectado no soro do paciente (n=11); e (3) não respondedores (NR), que são aqueles em que a carga viral continua sendo detectada durante o tratamento (n=47).

O estudo também contou com um grupo controle que compreendeu 20 pessoas entre discentes e docentes do Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, que não possuem hepatite C. Os indivíduos já tinham o teste anti-HCV negativo recente. Além disso, todos os participantes, entre pacientes e controles, assinaram um termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) (**Anexo 3**).

Foram obtidas amostras de sangue total coletado em tubos contendo anticoagulante EDTA para extração do DNA genômico da população de estudo.

4.2 Avaliação de parâmetros laboratoriais lipídicos

Para avaliação dos parâmetros laboratoriais lipídicos foram utilizados soros de pacientes com HCV que tiveram amostra coletada entre 48 horas e 7 dias após o início do tratamento antiviral. Também foram dosados os parâmetros lipídicos do grupo controle. Todos os soros estavam previamente armazenados em freezer a -80 °C.

4.2.1 Dosagem de Colesterol Total

Para a dosagem de colesterol total, foi utilizado o kit de colesterol monoreagente K083 (BioClin). Os parâmetros utilizados foram de acordo com as instruções do fabricante.

Em todos os tubos foram adicionados 1,0 mL de reagente enzimático e 10 microlitros (µl) de amostra. Para o padrão, ao invés de soro, foi acrescentado 10 µl de solução padrão com concentração conhecida de 200 mg/dL. Foi utilizado também uma solução apenas com reagente (branco).

Em seguida, os tubos foram colocados no banho-maria a 37 °C por 10 minutos. Após isso, as reações contendo as amostras foram colocadas em uma placa de 96 poços e a leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA Spectra Max 190 Microplate Reader (Molecular Services), pelo programa SoftMax[®] pro 5.4.1. Ao colocar a placa no leitor, o branco foi descontado das amostras e a leitura foi feita em 500 nm. Os valores obtidos foram calculados a partir da fórmula abaixo (**figura 12**):

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra} \times 200}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

Figura 12: Fórmula para cálculo de concentração de colesterol total. Fonte: Instruções de uso do kit Colesterol total (BioClin).

Os resultados foram obtidos em mg/dL. O valor de referência é < 190 mg/dL (FALUDI *et al.*, 2017).

4.2.2 Dosagem de Triglicerídeos

A dosagem de triglicerídeos foi realizada utilizando o kit específico Triglicérides monoreagente K117 (Bioclin). As instruções de uso foram seguidas de acordo com o manual do fabricante.

Foi colocado 1,0 mL de reagente enzimático em cada tudo, em seguida, acrescido 10 µl de soro. No padrão, ao invés de amostra, foi inserido 10 µl de solução padrão com concentração conhecida de 100 mg/dL. Para o branco, foi usado apenas tubo com reagente enzimático.

Por conseguinte, todos os tubos foram levados ao banho-maria por 10 minutos a 37 °C. Em seguida, foi colocado 200 µl de reação contendo as amostras em cada poço da placa de 96 poços e sua absorbância foi obtida pelo leitor de ELISA Spectra Max 190 Microplate Reader (Molecular Services), pelo programa SoftMax[®] pro 5.4.1. Após inserir a placa, o branco foi descontado das amostras e a leitura foi feita a 500nm. Os valores obtidos foram calculados pela fórmula abaixo (**figura 13**):

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra} \times 100}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

Figura 13: Fórmula para cálculo de concentração de triglicerídeos. Fonte: Instruções de uso do kit triglicérides monoreagente (BioClin).

Os resultados foram obtidos em mg/dL. O valor de referência é < 175 mg/dL na ausência de jejum (FALUDI *et al.*, 2017).

4.2.3 Dosagem de HDL

A dosagem de HDL foi realizada com o kit colesterol HDL enzimático K015 (Bioclin) e o kit colesterol total monoreagente K083 (Bioclin). Os parâmetros usados foram de acordo com o manual de instruções do fabricante.

Foram adicionados 250 µl de soro e 250 µl de reagente precipitante e homogeneizado em vórtex por 1 minuto. Em seguida, foi colocado em centrífuga clínica LS3-Plus (CELM) a 3.400 rpm por 15 minutos. A partir disso, foi retirado 50 µl do sobrenadante e imediatamente adicionado a 1 mL do reagente enzimático do kit de colesterol total. No padrão, ao invés do soro, foi adicionado 50 µl de solução padrão de concentração conhecida de 40 mg/dL. Foi utilizada também uma solução apenas com reagente (branco). Os tubos foram homogeneizados e colocados em banho-maria por 5 minutos a 37 °C.

Foi utilizado uma placa de 96 poços, onde foi colocado 200 µl de reação contendo as amostras em cada poço. Em seguida, as absorbâncias foram lidas pelo leitor de ELISA Spectra Max 190 Microplate Reader (Molecular Services), pelo programa SoftMax[®] pro 5.4.1. Ao inserir a placa, o branco foi descontado das amostras e a leitura foi realizada a 500nm. Os valores obtidos foram calculados a partir da fórmula abaixo (**figura 14**):

$$\text{HDL (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 80$$

Figura 14: Fórmula para cálculo de concentração de colesterol HDL. A concentração padrão do HDL é de 40 mg/dL. Porém, logo na primeira etapa ocorre uma diluição do soro em 1:2 com o reagente precipitante, dessa forma, a correção é feita com o dobro do valor na hora do cálculo, ou seja, 80mg/dL. Fonte: Instruções de uso do kit Colesterol HDL enzimático (BioClin).

Os resultados foram obtidos em mg/dL. O valor de referência é > 40 mg/dL (FALUDI *et al.*, 2017).

4.2.4 Cálculo LDL e VLDL

A realização dos cálculos de concentração de VLDL e LDL-colesterol se dá a partir das dosagens de colesterol total, triglicerídeos (TG) e HDL-colesterol das etapas anteriores. Para a VLDL, utilizou-se a fórmula abaixo (**figura 15**) e o valor de referência considerado foi de 30 mg/dL (KAMPFRATH, 2022):

$$\text{COLESTEROL VLDL} = \text{TG} / \text{F}$$

Figura 15: Fórmula para cálculo de concentração de colesterol VLDL. F refere-se ao fator da Fórmula de Martin (MARTIN *et al.*, 2013). Fonte: Do autor.

Para o cálculo de LDL-colesterol, desde 1972 era utilizado a fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD, 1972), entretanto, ela tinha algumas limitações. Com isso, MARTIN *et al.* (2013) propôs uma fórmula similar (**figura 16**) que possui melhor exatidão no cálculo ao utilizar um fator (f) que varia de 3,5 a 11,9 (**figura 17**), dependendo da concentração de colesterol não-HDL e triglicerídeos (FERRINHO *et al.*, 2021). Desta forma, o cálculo do LDL dos indivíduos estudados foi feito pela fórmula de Martin (**figura 16**), utilizando a calculadora *online* da MedCentral (<https://www.medcentral.com/calculators/cardiology/martin-equation-for-low-density-lipoprotein-ldl-c>).

$$\text{LDL} = \text{CHOL} - \text{HDL} - \frac{\text{TG}}{\text{f}}$$

Figura 16: Fórmula para cálculo de concentração de colesterol LDL. CHOL: colesterol total; TG: triglicerídeos; F: Fator. O fator varia de 3.5 a 11.9. Fonte: Morillo-Martínez *et al.*, 2021.

O valor de referência considerado foi <130 mg/dL para todos os pacientes, visto que não tínhamos a categoria de risco cardiovascular deles (FALUDI *et al.*, 2017).

Triglycerides [mg/dL]	Non-HDL Cholesterol [mg/dL]					
	<100	100-129	130-159	160-189	190-219	≥220
7-49	3.5	3.4	3.3	3.3	3.2	3.1
50-56	4.0	3.9	3.7	3.6	3.6	3.4
57-61	4.3	4.1	4.0	3.9	3.8	3.6
62-66	4.5	4.3	4.1	4.0	3.9	3.9
67-71	4.7	4.4	4.3	4.2	4.1	3.9
72-75	4.8	4.6	4.4	4.2	4.2	4.1
76-79	4.9	4.6	4.5	4.3	4.3	4.2
80-83	5.0	4.8	4.6	4.4	4.3	4.2
84-87	5.1	4.8	4.6	4.5	4.4	4.3
88-92	5.2	4.9	4.7	4.6	4.4	4.3
93-96	5.3	5.0	4.8	4.7	4.5	4.4
97-100	5.4	5.1	4.8	4.7	4.5	4.3
101-105	5.5	5.2	5.0	4.7	4.6	4.5
106-110	5.6	5.3	5.0	4.8	4.6	4.5
111-115	5.7	5.4	5.1	4.9	4.7	4.5
116-120	5.8	5.5	5.2	5.0	4.8	4.6
121-126	6.0	5.5	5.3	5.0	4.8	4.6
127-132	6.1	5.7	5.3	5.1	4.9	4.7
133-138	6.2	5.8	5.4	5.2	5.0	4.7
139-146	6.3	5.9	5.6	5.3	5.0	4.8
147-154	6.5	6.0	5.7	5.4	5.1	4.8
155-163	6.7	6.2	5.8	5.4	5.2	4.9
164-173	6.8	6.3	5.9	5.5	5.3	5.0
174-185	7.0	6.5	6.0	5.7	5.4	5.1
186-201	7.3	6.7	6.2	5.8	5.5	5.2
202-220	7.6	6.9	6.4	6.0	5.6	5.3
221-247	8.0	7.2	6.6	6.2	5.9	5.4
248-292	8.5	7.6	7.0	6.5	6.1	5.6
293-399	9.5	8.3	7.5	7.0	6.5	5.9
400-13975	11.9	10.0	8.8	8.1	7.5	6.7

Figura 17: Tabela de fatores que depende da quantidade de TG e Colesterol não HDL para o cálculo de LDL-colesterol pela Fórmula de Martin. Fonte: <https://www.medcentral.com/calculators/cardiology/martin-equation-for-low-density-lipoprotein-ldl-c>

4.3 Extração de DNA Genômico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de leucócitos do sangue total seguindo a metodologia adaptada de Miller *et al.* (1988). Em 5 mL de sangue, coletado no pré-tratamento, foram adicionados 10 mL de tampão de lise de hemácias (TLH) (155mM NH₄Cl; 10mM KHCO₃; 1mM EDTA pH 7.4) que foi mantido sob

agitação orbital constante por 30 minutos. Após este tempo, o material foi centrifugado a 1207 xg por 4 minutos, em centrífuga clínica. O precipitado foi lavado mais duas vezes com 5 mL deste mesmo tampão a fim de eliminar os restos celulares. Posteriormente, o precipitado foi ressuspensionado em 2 mL de tampão de lise de núcleo (TLN) (10mM de Tris-HCl, 400mM de NaCl, 2.0mM de EDTA pH 8,2). Ao tubo, foi adicionado dodecilsulfato de sódio (SDS) para uma concentração final de 0.1%, agitando-se o tubo levemente. Foi então adicionada proteinase K 20mg/mL e o tubo foi incubado a 37 °C ao longo da noite (*overnight*) ou a 55 °C por 2 horas. Após a digestão, os peptídeos foram precipitados por “*salting out*” pela adição de 1 mL de solução de NaCl saturada com agitação vertical vigorosa por 30 segundos. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 1207 xg por 10 minutos em centrífuga clínica. O sobrenadante foi então transferido para um tubo novo e o DNA precipitado por adição de dois volumes de etanol absoluto. O DNA foi colhido por centrifugação em centrífuga clínica a 1207 xg por 10 minutos. O DNA foi então ressuspensionado em TE-4 e incubado a 65 °C por 30 minutos, e mantido a 4 °C.

A concentração e qualidade de DNA foi determinada por espectrofotometria em equipamento Nanodrop® 2000 (ThermoFisher Scientific) a 260nm e parte do estoque foi diluída para uma concentração de 20 ng/μL.

4.4 Amplificação da região contendo o polimorfismo em APOB rs1042034 por reação em cadeia da polimerase

Para a amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR da região de interesse onde se encontra o polimorfismo APOB rs1042034, que possui 475 pb, foram utilizados iniciadores senso de sequência 5'-GGGAAGTAAAGTTAGAGGCACTG-3' e antisenso de sequência 5'-ACCTCTTGGGCTTCTTTTGA-3', previamente descritos por Akhtar Ali, 2016 e mapeados na **Figura 18**. O protocolo de amplificação foi padronizado (**Tabela 1**).

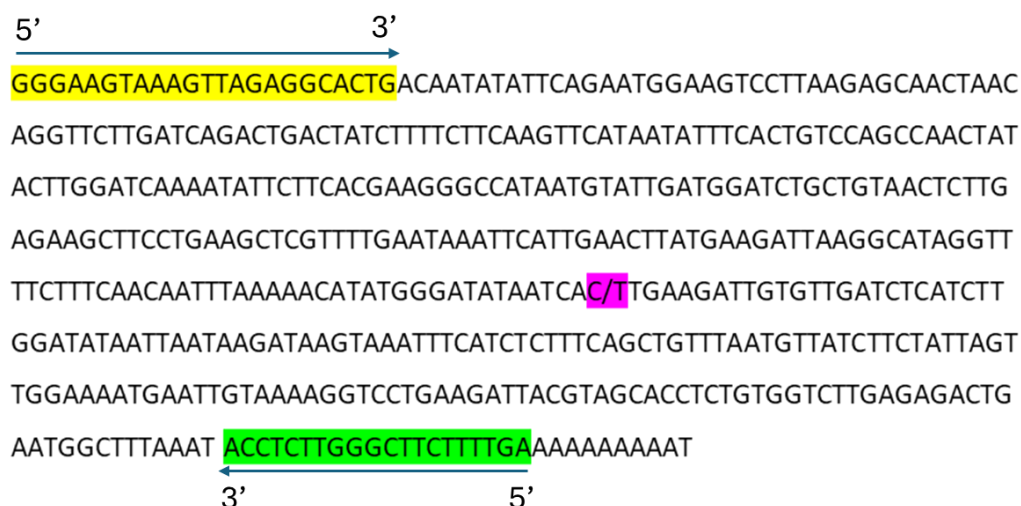


Figura 18: Mapeamento da região do polimorfismo em APOB rs1042034. Em amarelo: Sequência do *primer* senso; Em roxo: As possibilidades de bases que podem existir naquele rs; Em verde: Sequência do *primer* antisenso.
 Fonte: Do autor.

Tabela 1: Reação de amplificação da APOB rs1042034.

Reagentes	Concentração final	Volume
Água nuclease free	q.s.p. 50 µl	36 µl
Hot firepol 10x buffer B1 (-mg e detergente)	1X	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	2,5 mM	5 µl
dNTP (20 mM)	0,2 mM	0,5 µl
<i>Primer Forward</i> (10 µM)	0,2 µM	1 µl
<i>Primer Reverse</i> (10 µM)	0,2 µM	1 µl
Hot Firepol DNA polymerase (5 U/µl) (Sinapse)	0,05 U	0,5 µl
DNA (diluído a 20 ng/µl)	20 ng	1 µl
	Volume final	50 µl

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados; q.s.p: Quantidade suficiente para.

A reação foi realizada em equipamento Applied Biosystems Veriti 96 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States). A ciclagem utilizada foi: 95 °C - 5 minutos; 10 ciclos de 94 °C - 30 segundos, 60 °C - 30 segundos (diminuindo 1°C a cada ciclo), 72 °C - 45 segundos; seguido de 25 ciclos de 94 °C - 30 segundos, 52 °C - 30 segundos e 72 °C - 45 segundos (ALI *et al.*, 2016). Os *amplicons* foram devidamente armazenados em freezer a -20 °C.

4.5 Amplificação da região contendo o polimorfismo em APOB rs676210 por reação em cadeia da polimerase

Para a amplificação por PCR da região de interesse do polimorfismo APOB rs676210, que possui 167 pb, foram utilizados iniciadores senso de sequência 5'-TGTGTGTGAGATGTGGGGAA-3' e antisenso de sequência 5'-GGGATCTGAAGGTGGAGGAC-3', previamente descritos por Abdulfattah *et al.* 2021 e mapeados na **figura 19**. O protocolo de amplificação foi padronizado (**Tabela 2**).

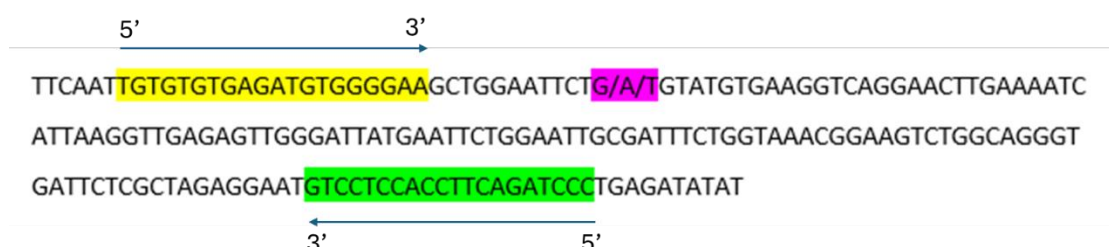


Figura 19: Mapeamento da região do polimorfismo em APOB rs676210. Em amarelo: Sequência do *primer* senso; Em roxo: As possibilidades de bases que podem existir naquele rs; Em verde: Sequência do *primer* antisenso. Fonte: Do autor.

Tabela 2: Reação de amplificação da APOB rs676210.

Reagentes	Concentração final	Volume
Água nuclease free	q.s.p. 50 µl	35 µl
Hot firepol 10x buffer B1 (-mg e detergente)	1X	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	2,5 mM	5 µl
dNTP (20 mM)	0,2 mM	0,5 µl
<i>Primer Forward</i> (10 µM)	0,2 µM	1 µl
<i>Primer Reverse</i> (10 µM)	0,2 µM	1 µl
Hot Firepol DNA polymerase (5 U/µl) (Sinapse)	0,05 U	0,5 µl
DNA (diluído a 20 ng/µl)	20 ng	2 µl
	Volume final	50 µl

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados; q.s.p: Quantidade suficiente para

A reação foi feita em equipamento Applied Biosystems Veriti 96 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) sob a ciclagem: Temperatura inicial de 95 °C - 6 minutos; 5 ciclos de desnaturação 95 °C - 25 segundos, 60 °C - 25 segundos, 72 °C - 20

segundos. Seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C - 20 segundos, 59 °C - 30 segundos, 72 °C - 20 segundos (ABDULFATTAH *et al.* 2021). Os *amplicons* foram devidamente armazenados em freezer a -20 °C.

4.6 Amplificação da região contendo o polimorfismo em APOA1 rs964184 por reação em cadeia da polimerase

Para a amplificação por PCR da região de interesse do polimorfismo APOA1 rs964184, que possui 415 pb, foram utilizados iniciadores *senso* de sequência 5'-AGATACCCACACAGCTCACTCC-3' e *antisenso* de sequência 5'-CAGCACTGGCCTCTGTATTGACC-3', previamente descritos por Esperança, *et al.* 2016 e mapeados na **figura 20**. O protocolo de amplificação foi padronizado (**Tabela 3**).

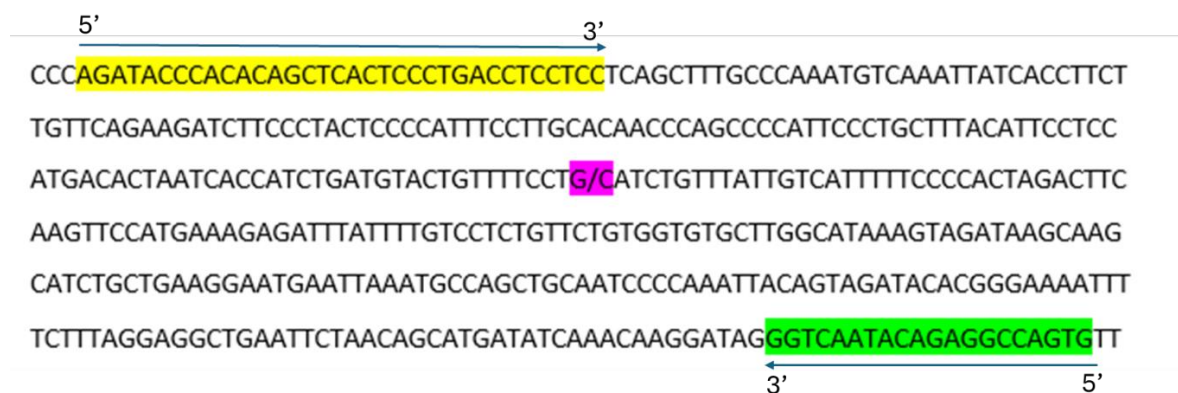


Figura 20: Mapeamento da região do polimorfismo em APOA1 rs964184. Em amarelo: Sequência do *primer* senso; Em roxo: As possibilidades de bases que podem existir naquele rs; Em verde: Sequência do *primer* antisenso. Fonte: Do autor.

Tabela 3: Reação de amplificação da APOA1 rs964184.

Reagentes	Concentração final	Volume
Água nuclease free	q.s.p. 50 µl	36 µl
Hot firepol 10x buffer B1 (-mg e detergente)	1X	5 µl
MgCl ₂ 25mM	2,5 mM	5 µl
dNTP (20mM)	0,2 mM	0,5 µl
Primer Forward (10µM)	0,2 µM	1 µl
Primer Reverse (10µM)	0,2 µM	1 µl
Hot Firepol DNA polymerase (5U/µl) (Sinapse)	0,05 U	0,5 µl
DNA (diluído a 20 ng/µl)	20 ng	1 µl
	Volume final	50 µl

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados; q.s.p: Quantidade suficiente para

A reação foi feita em equipamento Applied Biosystems Veriti 96 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) sob a ciclagem: 95 °C - 5 minutos; 94 °C - 30 segundos; 62 °C - 45 segundos; 72°C - 30 segundos (35 ciclos); 72°C - 10 minutos (ESPERANÇA, *et al.* 2016). Os *amplicons* foram devidamente armazenados em freezer a -20 °C.

4.7 Amplificação da região contendo o polimorfismo em LDLR rs5925 por reação em cadeia da polimerase

Para a amplificação por PCR da região de interesse do polimorfismo LDLR rs5925, que possui 218 pb, foram utilizados iniciadores senso de sequência 5'-GTCATCTTCCTTGCCTGTTTAG-3' e antisenso de sequência 5'-GTTTCCACAAGGAGGTTTCAAGGTT-3', previamente descritos por Rojas, *et al.* 2019 e mapeados na **figura 21**. O protocolo de amplificação foi padronizado (**Tabela 4**).

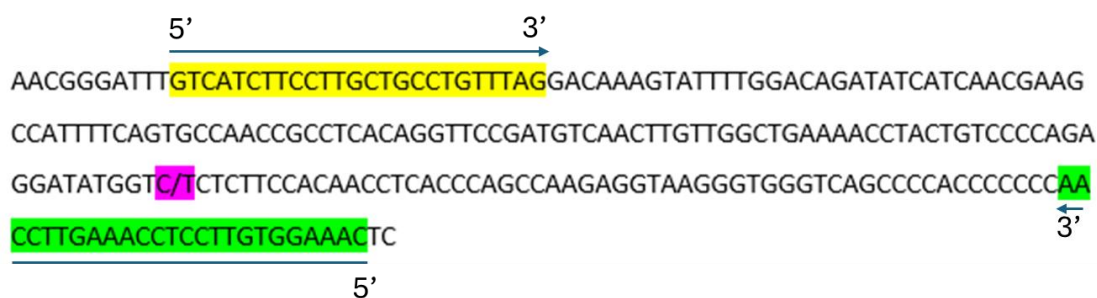


Figura 21: Mapeamento da região do polimorfismo em LDLR rs5925. Em amarelo: Sequência do *primer* sentido; Em roxo: As possibilidades de bases que podem existir naquele rs; Em verde: Sequência do *primer* antissenso. Fonte: Do autor.

Tabela 4: Reação de amplificação da LDLR rs5925.

Reagente	Concentração final	Volume
Água Nuclease free	q.s.p. 50 µl	35 µl
Hot firepol 10x buffer B1 (-mg e detergente)	1X	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	2,5 mM	5 µl
dNTP (20 mM)	0,2 mM	0,5 µl
<i>Primer Forward</i> 10 µM	0,2 µM	1 µl
<i>Primer Reverse</i> 10 µM	0,2 µM	1 µl
Hot Firepol DNA polymerase (5 U/µl) (Sinapse)	0,05 U	0,5 µl
DNA (diluído a 20 ng/µl)	20 ng	2 µl
	Volume final	50 µl

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados; q.s.p: Quantidade suficiente para.

A reação foi feita em equipamento Applied Biosystems Veriti 96 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) sob a ciclagem: 95 °C - 5 minutos; 95 °C - 1 minuto; 58 °C - 1 minuto; 72 °C - 1 minuto (35 ciclos); 72°C - 7 minutos (ROJAS *et al.*, 2019). Os *amplicons* foram devidamente armazenados em freezer a -20°C.

4.8 Confirmação da amplificação por eletroforese em gel de agarose a 1,5%

Os produtos gerados das amplificações das regiões gênicas de interesse foram analisados a partir de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Foi realizado o preparo

do gel com tampão TRIS-ACETATO-EDTA (TAE) 1X. Foram adicionados 1,5 gramas de agarose em 100 mL de TAE e aquecido em micro-ondas por alguns minutos para a dissolução completa do soluto. Em seguida, foi despejado na cuba sob os moldes para a formação dos poços depois de solidificado.

Foram aplicados em cada poço um *mix* contendo: 3 µl de tampão de amostra 5x, 2 µl de corante GELRED (Biotium) 100X e, por fim, 5 µl de amostra (*amplicon*). Para indicar o tamanho do *amplicon*, foi inserido 2 µl de padrão de peso molecular de 100 a 1000 pb (Jena Bioscience). A corrida foi realizada a 100 V por 40 minutos e a visualização dos *amplicons* foi feita em transiluminador (Vilber Lourmart).

4.9 Sequenciamento automático dos produtos de PCR para avaliação dos polimorfismos em genes de APOB, APOA1 e LDLR pelo método Sanger

Os sequenciamentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Macromolecular Firmino Torres de Castro no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) da UFRJ. Todos os *amplicons* foram dosados em espectrofotômetro Nanodrop® (ThermoFisher Scientific™) e diluídos para 3 ng/µl.

A montagem da placa foi seguindo o protocolo BigDye Terminator adaptado da Thermo Fisher. A primeira etapa consistiu em preparar o *mix* contendo o tampão de sequenciamento (Sequencing Buffer 5X) e BigDye Mix na proporção 2:1. Em seguida foi adicionado 3 µl desse preparo em cada poço da placa de 96 poços. Após isso, foi adicionado 1 µl dos *primers* senso e antisenso em poços diferentes. O DNA foi adicionado de acordo com o tamanho do *amplicon*, da seguinte forma: para *amplicons* menores que 200 pb foi adicionado 1 µl de DNA e para *amplicons* maiores que 200 pb foi adicionado 3,33 µl de DNA. Ao final, a água nuclease *free* foi acrescentada para completar o volume final de 10 µl em cada poço. Por conseguinte, essa placa foi colocada na Applied Biosystems Veriti 96 Thermal Cycler (Thermo Scientific™) sob as condições de ciclagem: 96 °C por 1 minuto; 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos, e 60 °C por 4 minutos.

A segunda etapa consistiu na precipitação do DNA pelo método Etanol/EDTA/Acetato de sódio. Foi acrescido 1 µl de EDTA pH 8,0 125Mm, 1 µl de acetato de sódio a 3M e 25 µl de etanol absoluto. Em seguida, a placa foi colocada no freezer a -20 °C *overnight*. No dia seguinte, a placa foi centrifugada a 3.400 rpm por 45

minutos em centrífuga HERMLE Z326K Labortechnik GmbH a 4 °C. Após isso, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 70 µl de etanol 70 % preparado na hora e gelado. Uma nova centrifugação foi feita a 3.400 rpm por 15 minutos e novamente o sobrenadante foi descartado. Para que não houvesse nenhum resquício de etanol, a placa foi colocada no termociclador com a tampa aberta a 60 °C por 10 minutos.

Na terceira etapa, foi colocado 10 µl de formamida HI-DI (Thermo Fisher Scientific) em cada poço e a placa colocada no termociclador para a desnaturação a 95 °C por 2 minutos, seguido de 1 minuto no gelo. Finalmente, a placa foi inserida no analisador genético 3500 Series Genetic Analyzers (Thermo Scientific™). Em todas as placas foi utilizado o protocolo Fast Sequencing FastSeq50_POP7 que leva em torno de 65 minutos para a leitura de cada coluna e lê amplicons de até 700 pb.

4.10 Análise dos eletroferogramas e determinação da genotipagem

Os arquivos gerados a partir do sequenciador estavam em formato.abi contendo a sequência da região amplificada de cada amostra de paciente e de controle negativo, bem como os picos de fluorescência correspondente a cada base nitrogenada presente naquela região. Os arquivos foram exportados e analisados pelo programa BioEdit versão 7.2 (Informer Technologies, Inc). Ao abrir um arquivo, procurou-se pela região mais próxima ao polimorfismo e ao encontrar o local correto, é visto qual base nitrogenada o indivíduo tem naquela região e a partir disso, é possível determinar o genótipo.

Para todos os polimorfismos analisados há três possibilidades de genótipos. Para o polimorfismo APOB rs1042034: CC, CT e TT. Para o polimorfismo APOB rs676210: GG, GA e AA. Para o polimorfismo APOA1 rs964184: GG, GC e CC. E, por fim, para o polimorfismo LDLR rs5925: CC, CT e TT.

4.11 Análise estatística dos dados

As análises de associação entre genótipos e características demográficas, clínicas e laboratoriais foram feitas com 100 pacientes dentre os 109 genotipados,

uma vez que 9 pacientes possuíam escassez de dados. Foi feita a frequência alélica e genotípica dos pacientes e indivíduos controles em Excel. Posteriormente, foi avaliado se havia diferença na frequência genotípica entre pacientes e controles utilizando teste do qui-quadrado em *software* GraphPad Prism v. 8.0 (Dotmatics), sendo considerado significativo valores de $p < 0.05$. Em seguida, foram realizados o teste do qui-quadrado para as tabelas de contingência com 3 variáveis. O modelo genético aditivo visa buscar se alguns genes de maneira independente entre si podem contribuir para traços fenotípicos que irão se perpetuar na população. O teste exato de Fisher foi usado para a tabela de contingência com apenas duas variáveis no modelo dominante e no modelo recessivo (SETU & BASAK 2021). A escolha do alelo dominante se deu de acordo com o alelo associado à doença (alelo de risco) (MINELLI *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2016).

O coeficiente de Pearson é um fator importante para a determinação do quão forte é a correlação entre as variáveis em questão, e os valores variam de -1 a +1, dependendo da intensidade da relação. O teste foi realizado levando em consideração as características do paciente e os alelos de cada SNP.

Para verificar se a população está em equilíbrio, ou seja, se há constância entre os alelos e os genótipos ao longo das gerações (NEAMATZADEH *et al.*, 2024), foi utilizado o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Para esta análise foi utilizado o *software* *WpCalc* disponível em <https://wpcalc.com/em/equilibrium-hardy-weinberg/> e o valor qui-quadrado convertido em valor de p através da calculadora da Universidade de San Mateo County Community College District, disponível em <https://smccd.edu/>.

5. Resultados

Este trabalho foi realizado com material biológico de pacientes com hepatite C crônica. Foram feitas a frequência genotípica e alélica de todos os pacientes, bem como as dosagens lipídicas. Porém, a relação em tabelas de contingência e correlação de múltiplas variáveis com características clínico-demográficas foram realizadas com 100 dos 109 pacientes, pois 9 não tinham informações nos prontuários médicos.

O recrutamento da população de controles negativos da população controle se iniciou em 2024 e pelo número pequeno de indivíduos incluídos até o momento, apenas as frequências genotípicas e alélicas foram realizadas.

5.1 Dados laboratoriais e demográficos da população do estudo

Este é um estudo retrospectivo, dessa forma, nem todos os pacientes possuem os dados completos nos prontuários médicos, com isso, o número de cada característica varia ao longo da tabela. O “n” utilizado em cada característica está especificado na **tabela 5**.

Tabela 5: Características clínico-laboratoriais e demográficas dos pacientes com hepatite C crônica.

Características (N = número de pacientes)	Frequência (mín-máx)	Média
Gênero (n=100)	Masculino: 59% Feminino: 41%	
Genótipo viral (n=100)	Genótipo 1: 83% Genótipo 3: 17%	
IMC (n=92)	Normal (até 24,99): 40% Elevado (> 25,01): 55% (19,21 – 37,87)	25,99
Idade (n=96)	+40: 87,5% -40: 12,5%	52,75

	(24 -74)	
Diabetes (n=100)	Sim: 16% Não: 84%	
Hipertensão (n=100)	Sim: 39% Não: 61%	
Hemotransfusão (n=100)	Sim: 28% Não: 72%	
Alcoolismo (n=100)	Sim: 3% Não: 97%	
ALT elevado (n=74)	Sim: 77% Não: 23%*	
GGT elevado (n=80)	Sim: 48,75% Não: 51,25%*	
Grau de Fibrose (n=86) pré-tratamento	Leve (F1/F2): 62,80% Grave (F3/F4): 37,20%	
Cirrose pré-tratamento (n=91)	Sim: 28,57% Não: 71,43%	
Carga viral pré-tratamento (n=98)	Elevada (>600.000 UI/mL): 47,96% Baixa (<600.000 UI/mL): 52,04% (< 25 UI/mL - >5000000 UI/mL)	1.486.225 UI/mL
Resposta ao tratamento (n= 91)	RVS: 36,26% NR+REC: 63,74%	
Grau de fibrose pós-tratamento (n=38)	Leve (F1/F2): 47,37% Grave (F3/F4): 52,63%	
Cirrose pós-tratamento (n=38)	Sim: 52,63% Não: 47,37%	
Esteatose pós-tratamento (n=99)	Sim: 20,20% Não: 79,80%	
Colesterol total (n=86)	Normal (<190 mg/dL): 34,88% Elevado (≥190mg/dL): 65,12% (54,26 mg/dL - 466,67 mg/dL)	250,23 mg/dL
Triglicerídeos (n=86)	Normal (<175mg/dL): 53,49% Elevado (≥175mg/dL): 46,51% (65,22 mg/dL – 1043,00 mg/dL)	218,57 mg/dL
HDL (n=86)	Normal: 83,72%	29,33 mg/dL

	Elevado (≤ 40 mg/dL): 16,27% (3,88 mg/dL - 143,05 mg/dL)	
LDL (n=79)	Normal (<130 mg/dL): 34,18% Elevado (≥ 130 mg/dL): 65,82% (12,53 mg/dL - 628,59 mg/dL)	182,16 mg/dL
VLDL (n=79)	Normal (<30 mg/dL): 44,30% Elevado (≥ 30 mg/dL): 55,70% (13,46 mg/dL - 67,43 mg/dL)	30,93 mg/dL
Colesterol não-HDL (n=79)	Normal (<130 mg/dL): 25,85% Elevado (>130 mg/dL): 75,15% (44,57 mg/dL - 645,46 mg/dL)	219,48 mg/dL

Min: Mínimo; Max: Máximo; ALT: Alanina aminotransferase; GGT: Gama Glutamil transpeptidase; RVS: Resposta Viroológica Sustentada; NR: Não respondedor; REC: Redicivante; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade. *Critérios de valores normais definidos pelo Serviço de Hepatologia do HUCFF-UFRJ e não disponibilizados nos prontuários médicos.

Ao observarmos a tabela acima, observou-se que os pacientes são em sua maioria homens (59%). Os genótipos de HCV encontrados na população de estudo foi o 1 com prevalência de 83%, seguido do genótipo 3 com 17%. Cinquenta e cinco por cento (55%) dos pacientes tinham o IMC elevado, com média de 25,99 que indica sobrepeso (faixa entre 25,00 e 29,90). A média de idade encontrada foi de 52,75.

A maioria dos pacientes relatou não ter diabetes (84%), não ser hipertenso (61%) e não ter passado por hemotransfusão (72%). O alcoolismo foi encontrado em apenas 3% dos pacientes. Cerca de 77% dos pacientes apresentaram ALT elevado, que indica lesão hepática, problema causado pela infecção pelo HCV. GGT também é um indicativo de problemas no fígado e não se mostrou elevado na maioria dos pacientes (51%).

Antes do início do tratamento, alguns parâmetros foram investigados para se avaliar o grau de comprometimento do fígado. A maior parte dos pacientes (62%) apresentavam um leve grau de fibrose (F1/F2 METAVIR) e 71,42% não apresentavam cirrose antes de iniciar o tratamento. Apenas 47,96% dos pacientes tinham carga viral elevada (acima de 600000 UI/mL, ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 2013). Após o tratamento, foi visto que 63,74% não respondeu ao tratamento antiviral ou apresentou recidiva. Dos 38 pacientes que apresentavam dados de fibrose no pós-tratamento, 52,63% apresentavam grau de fibrose grave e cirrose (F3/F4 METAVIR). Apenas 20,20% apresentaram esteatose hepática após o tratamento.

As dosagens lipídicas mostraram que 65,12% dos pacientes estavam com colesterol total acima dos valores de referência. Entretanto, os valores de triglicerídeos estava dentro da normalidade em 53,49% dos pacientes. O HDL-colesterol, considerado o colesterol “bom”, se mostrou normal em 83,72% dos pacientes. Porém, o LDL-colesterol, o colesterol “ruim”, se mostrou elevado em 65,82% dos pacientes, assim como o VLDL-colesterol (em 55,70% dos pacientes) e o colesterol não-HDL (em 75,15% dos casos).

Tabela 6: Características laboratoriais e demográficas da população controle

Características (N=número de pacientes)	Frequência (<i>mín-máx</i>)	Média
Gênero (n=20)	Masculino: 35% Feminino: 65%	
Idade (n=20)	-40: 70% +40: 30% (19-53)	32
Colesterol Total (n=12)	Normal: 8,30 (<190mg/dL) Elevado: 91,70% (>190mg/dL) (176,55 mg/dL – 313,10 mg/dL)	243,94 mg/dL
Triglicerídeos (n=12)	Normal: 83,30% (<175 mg/dL) Elevado: 16,70% (>175 mg/dL) (43,63 mg/dL – 121 mg/dL)	77,13 mg/dL
HDL (n=12)	Normal: 100% (>40mg/dL) (43,0 mg/dL - 76,9 mg/dL)	60,40 mg/dL
LDL (n=12)	Normal: 8,40% (<130 mg/dL). Elevado: 91,60% (>130 mg/dL) (99,7 mg/dL – 237,37 mg/dL)	165,83 mg/dL
VLDL (n=12)	Normal: 8,30% (<30 mg/dL) Elevado: 91,70% (> 30 mg/dL) (16,36 mg/dL – 30,12 mg/dL)	31,12 mg/dL
Colesterol não-HDL (n=12)	Normal 8,30 (<130 mg/dL) / Elevado: 91,70% (>130 mg/dL) (141 mg/dL - 292,41 mg/dL)	193,63 mg/dL

Min: Mínimo; Max: Máximo; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade.

Na tabela acima encontramos algumas características da população controle. A maioria são mulheres (65%), em idade menor que 40 anos (70%). As dosagens

lipídicas indicaram que a maioria está com o colesterol total elevado (91,70%), LDL elevada (91,60%), VLDL elevada (91,70%) e colesterol não HDL elevado (91,70%). Entretanto, todos os indivíduos estão com HDL (100%) e triglicerídeos (83,30%) dentro dos valores de referência.

5.2 Amplificação dos fragmentos de DNA

Após as reações de amplificação das regiões gênicas de interesse, foram realizadas corridas de eletroforese em gel de agarose para visualização dos fragmentos de DNA amplificados. Assim, foi verificado se estavam de acordo com o tamanho esperado para cada região, conforme a literatura. Abaixo está exemplificado um gel de agarose de cada região gênica.

Na **Figura 22**, temos a região APOB rs1042034 com 9 amostras (contendo fragmentos de 475 pb), controle negativo e padrão de peso.

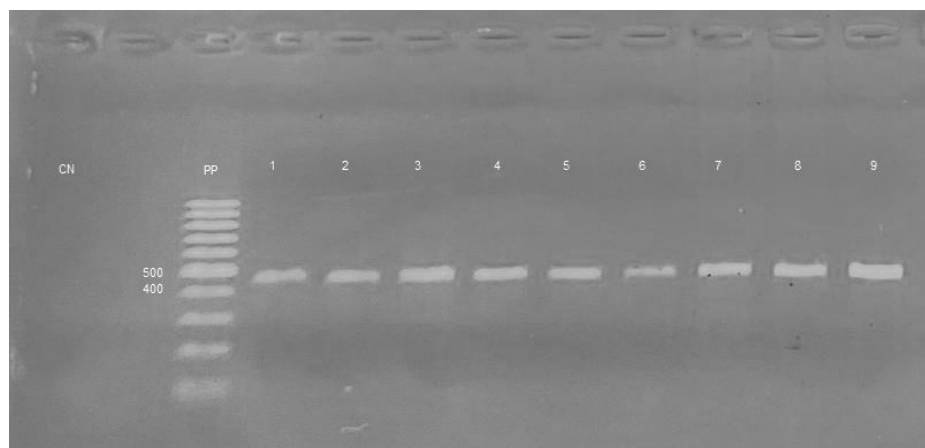


Figura 22: Gel de agarose a 1,5% corado com GELRED. Fragmentos de DNA amplificados na região APOB rs1042034. CN: Controle negativo; PP: Padrão de peso; 1 ao 9: amostras amplificadas.

Na **Figura 23** temos a região APOB rs676210 com 10 amostras amplificadas (contendo fragmentos de 167 pb), controle negativo e padrão de peso.



Figura 23: Gel de agarose a 1,5% corado com GELRED. Fragmentos de DNA amplificados na região APOB rs676210. CN: Controle negativo; PP: Padrão de peso; 1 ao 9: Amostras amplificadas.

Na **Figura 24** temos a região APOA1 rs964184 com 10 amostras amplificadas (contendo fragmentos de 415 pb) com controle negativo e padrão de peso.

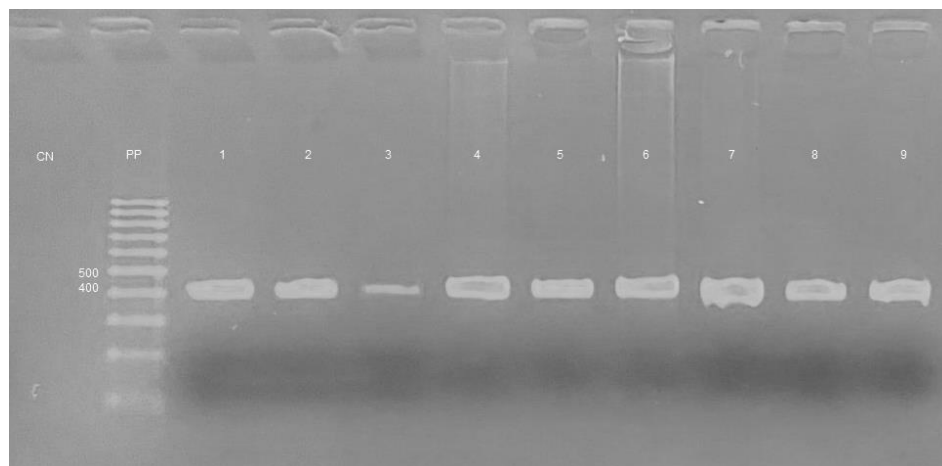


Figura 24: Gel de agarose a 1,5% corado com GELRED. Fragmentos de DNA amplificados na região APOA1 rs964184. CN: Controle negativo; PP: Padrão de peso; 1 ao 9: Amostras amplificadas.

Na **Figura 25** vemos região LDLR rs5925 com 6 amostras amplificadas (contendo fragmentos de 200 pb) com controle negativo e padrão de peso.

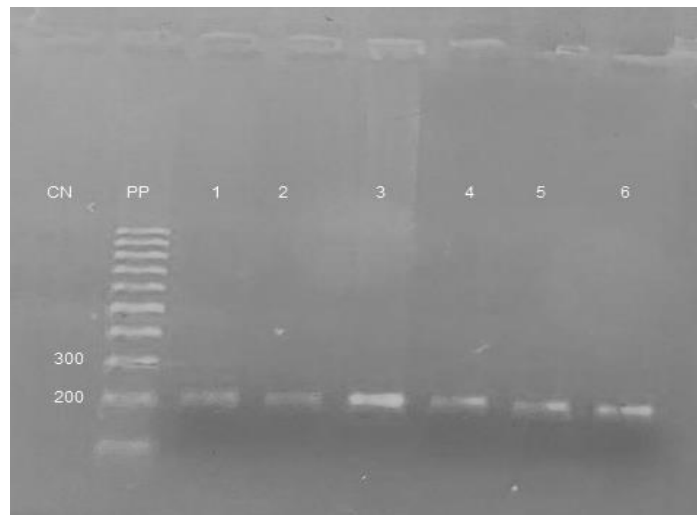


Figura 25: Gel de agarose a 1,5% corado com GELRED. Fragmentos de DNA amplificados na região LDLR rs5925. CN: Controle negativo; PP: Padrão de peso; 1 a 6: Amostras amplificadas.

Os resultados acima são representativos das amostras da população de estudo e confirmaram a amplificação dos fragmentos de DNA no tamanho esperado para cada região nos genes avaliados.

5.3 Análise dos eletroferogramas e determinação dos genótipos

Após a visualização dos fragmentos de DNA no gel de agarose, os *amplicons* foram devidamente sequenciados para a determinação do genótipo de cada paciente. Os eletroferogramas foram analisados e o genótipo de cada paciente foi identificado e anotado para a realização das frequências alélicas e genotípicas, assim como das correlações com dados demográficos, clínicos e laboratoriais. Abaixo estão exemplificados os eletroferogramas contendo as regiões gênicas analisadas para os três possíveis genótipos de cada polimorfismo APOB rs 1042034, APOB rs 676210, APOA1 rs 964184 e LDLR rs5925 estudado (**figuras 26-29**).

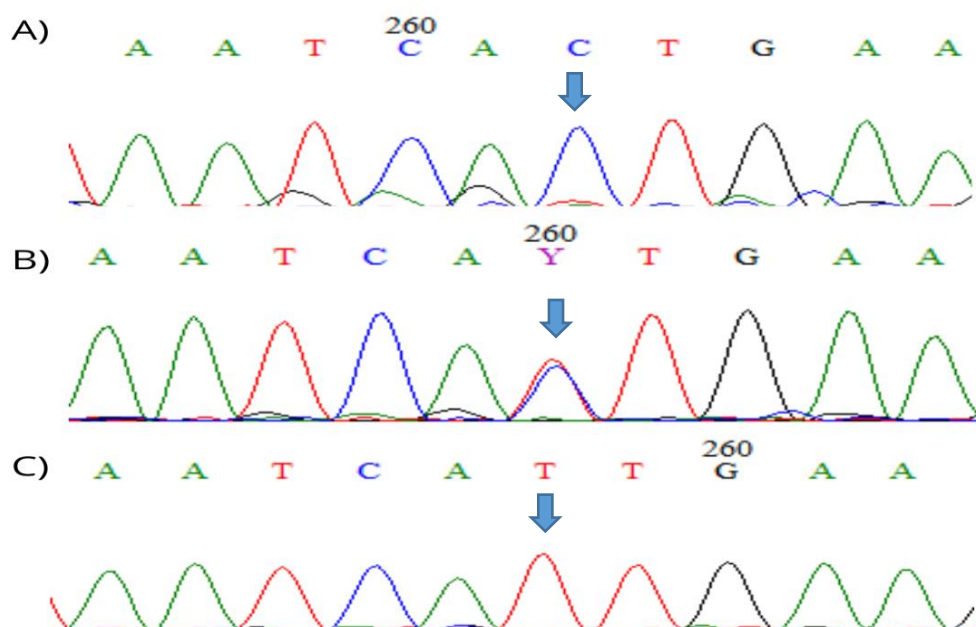


Figura 26: Eletroferogramas dos genótipos encontrados na região em APOBrs1042034. Local do polimorfismo representado pela seta azul. A) Genótipo duplo homozigoto CC; B) Genótipo heterozigoto CT; C) Genótipo duplo homozigoto TT.

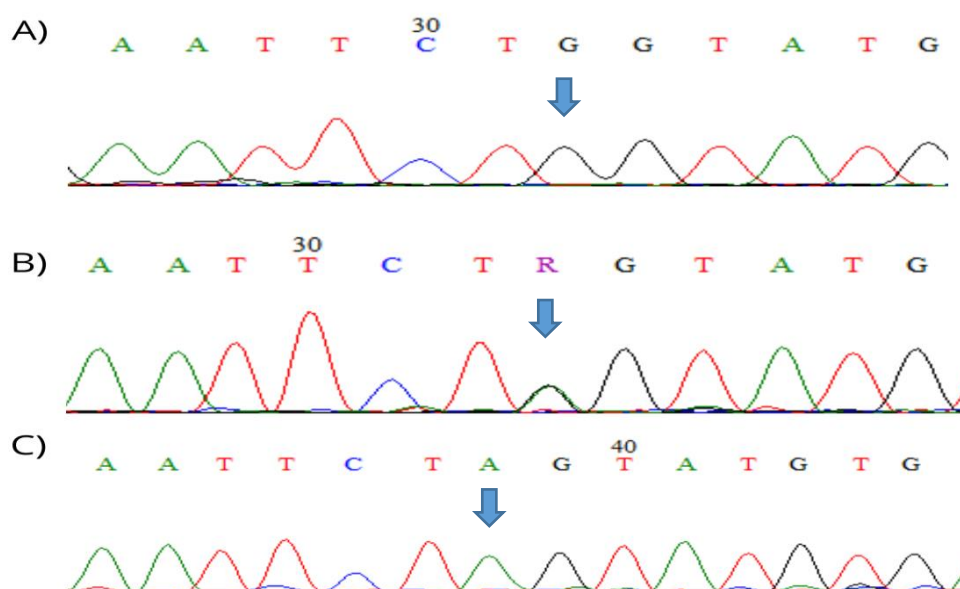


Figura 27: Eletroferogramas dos genótipos encontrados na região em APOB rs676210. Local do polimorfismo representado pela seta azul. A) Genótipo duplo homozigoto GG; B) Genótipo heterozigoto GA; C) Genótipo duplo homozigoto AA.

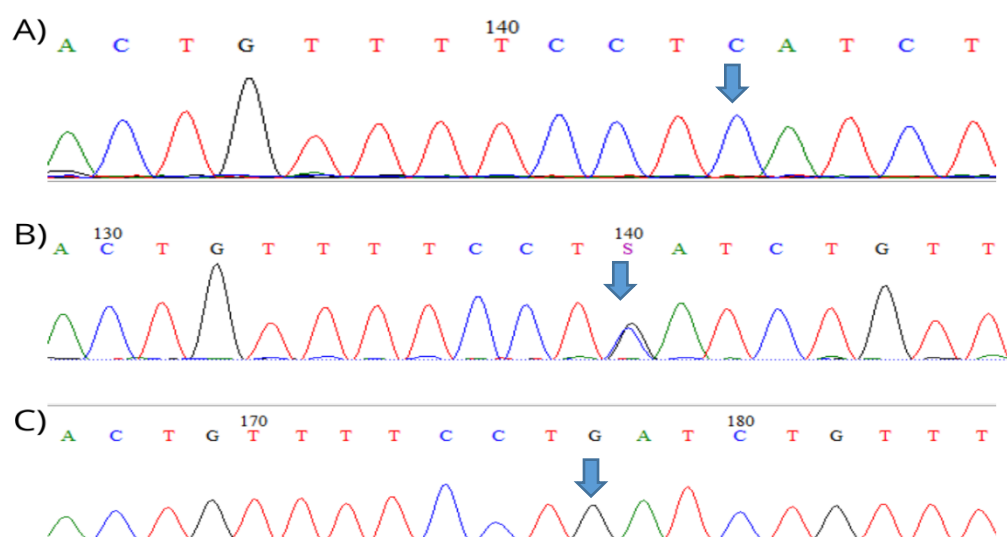


Figura 28: Eletroferogramas dos genótipos encontrados na região em APOA1rs964184. Local do polimorfismo representado pela seta azul. A) Genótipo duplo homozigoto CC; B) Genótipo heterozigoto CG; C) Genótipo duplo homozigoto GG.

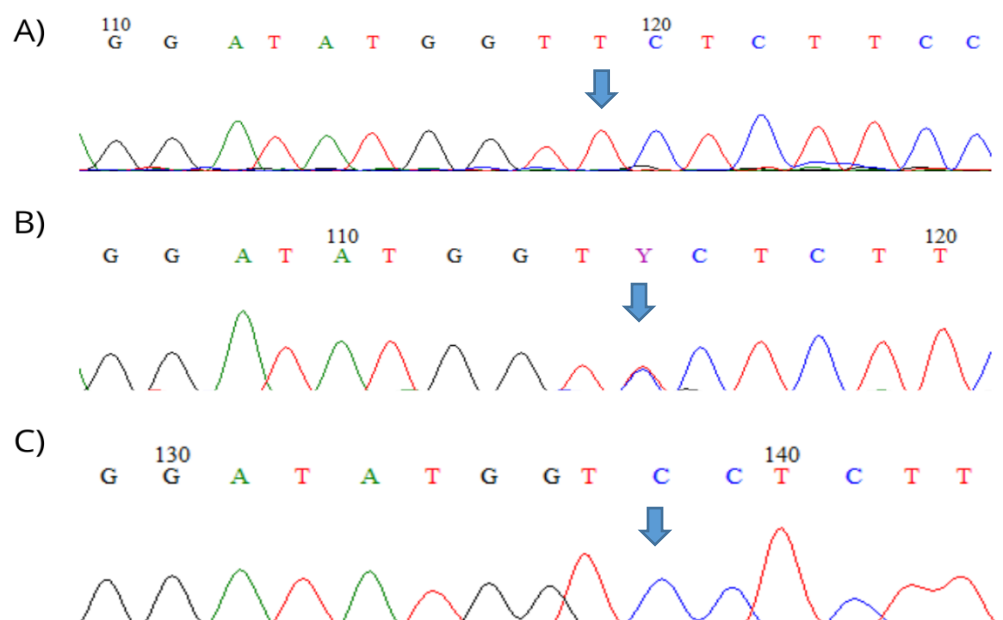


Figura 29: Eletroferogramas dos genótipos encontrados na região em LDLR rs5925. Local do polimorfismo representado pela seta azul. A) Genótipo duplo homozigoto TT; B) Genótipo heterozigoto CT; C) Genótipo duplo homozigoto CC.

Ao buscar na literatura trabalhos que envolviam o polimorfismo em APOB, verificou-se que os SNPs em rs1042034 e em rs676210 estavam em desequilíbrio de ligação. Foram feitas algumas genotipagens em alguns pacientes para observar se esse comportamento se repetiria na nossa população de estudo. Observou-se uma concordância entre homozigotos

e heterozigotos nas posições rs676210 e rs1042034, respectivamente. Foi visto que o mesmo paciente que tinha o genótipo TT para o rs1042034 tinha o genótipo GG para APOB rs676210, bem como o que tinha genótipo CC para rs1042034, tinha o AA para o rs676210 e o que tinha o genótipo CT para rs1042034, tinha o genótipo GA para o rs676210 (figura 30).

Crônicos	167pb	475 pb
Paciente	ApoB rs676210	ApoB rs1042034
1		TT
2		TT
3		CT
4		TT
5	GA	CT
6	GA	CT
7	GG	TT
8	GG	TT
9	GG	TT
10	GG	TT
11		TT
12	GA	CT
13		CT
14		CT
15		TT
16	AA	CC

Figura 30: Genótipos em APOB rs676210 e APOB rs1042034.

Com essa informação comprovada, resolvemos continuar as associações apenas com o SNP em APOB rs1042034.

5.4 Frequência Genotípica e Alélica na população estudada

Assim que obtivemos os genótipos de todos os pacientes, foi calculado o equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW). O EHW é utilizado para saber se a frequência de genótipos e alelos serão constantes para a próxima geração. Para isso, os dados utilizados foram a quantidade de homozigotos comuns, homozigotos raros e heterozigotos, o que fornece um valor em qui-quadrado que é convertido em valor de p que não deve ser significativo, ou seja, deve ser $>0,05$. Os resultados nos indicam que a população está em EHW.

- Equilíbrio de Hardy-Weinberg APOB rs1042034 = 0.1112 e o valor de $p = 0,7387$
- Equilíbrio de Hardy-Weinberg APOA rs964184 = 0.9713 e o valor de $p = 0,3243$

- Equilíbrio de Hardy-Weinberg LDLR rs5925 = 1.8216 e o valor de $p=0,1771$

Após os cálculos do EHW, foram feitos os gráficos de frequência genotípica e alélica tanto dos pacientes quanto do grupo controle. Para a posição em APOB rs1042034, 67% dos pacientes foram identificados como duplo homozigoto T ($n=73$). Em seguida, o genótipo CT foi o segundo mais prevalente em 29,4% ($n=32$) dos pacientes e por último, o genótipo CC com 3,7% ($n=4$) (**Figura 31**).

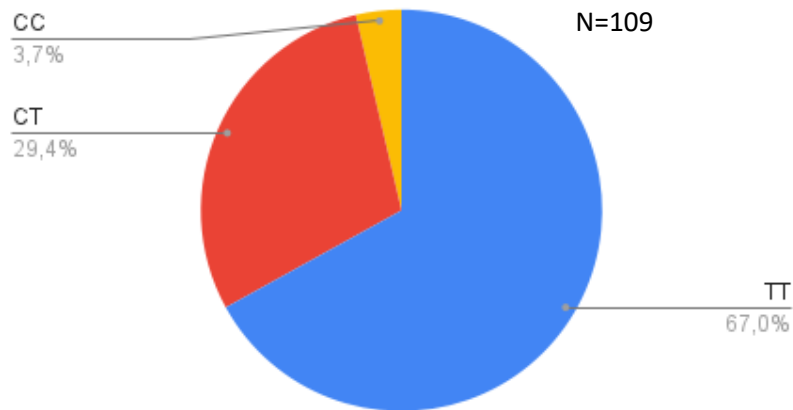


Figura 31: Frequência genotípica dos pacientes em APOB rs1042034. Percentual dos genótipos CC ($n=4$), CT ($n=32$) e TT ($n=73$) encontrados.

Para o grupo controle, as frequências genotípicas encontradas foram parecidas com as que foram vistas para o grupo de pacientes. Onde 60% dos indivíduos são duplo homozigotos T ($n=12$), 35% são heterozigotos CT ($n=7$) e apenas 5% ($n=1$) apresentam genótipo CC (**Figura 32**).

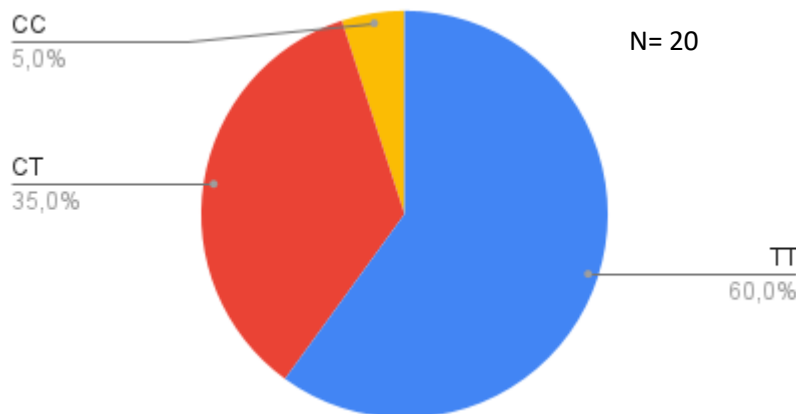


Figura 32: Frequência genotípica do grupo controle em APOB rs1042034. Percentual dos genótipos CC ($n=1$), CT ($n=7$) e TT ($n=12$) encontrados.

Em seguida foi realizado o cálculo de frequência alélica para os pacientes, os quais observou-se 82% (n=89) dos indivíduos com alelo T e 18% (n=20) com alelo C (**Figura 33**).

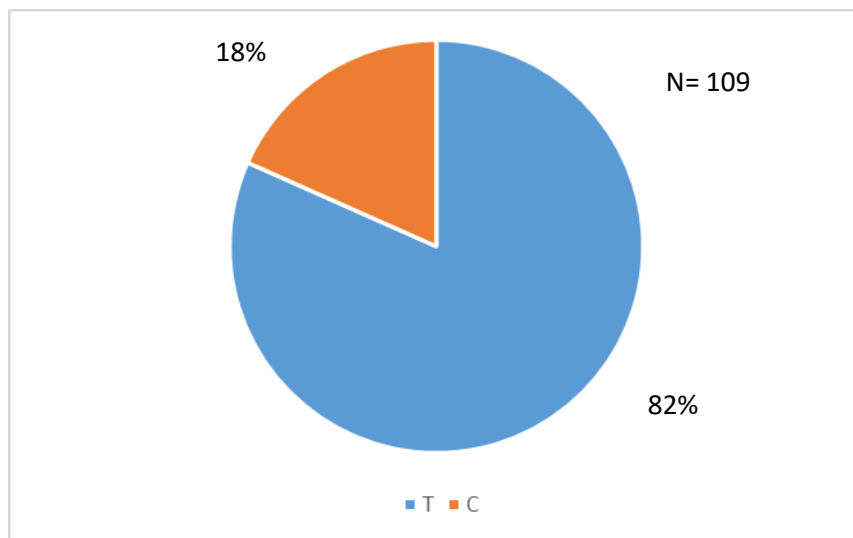


Figura 33: Frequência alélica dos pacientes em APOB rs1042034.

Ao realizar o cálculo de frequência alélica no grupo controle, vimos as frequências de alelo T (78%, n=15) e C (22%, n=5) bem parecidos com a que encontramos para o grupo controle, embora o N tenha sido menor (**Figura 34**).

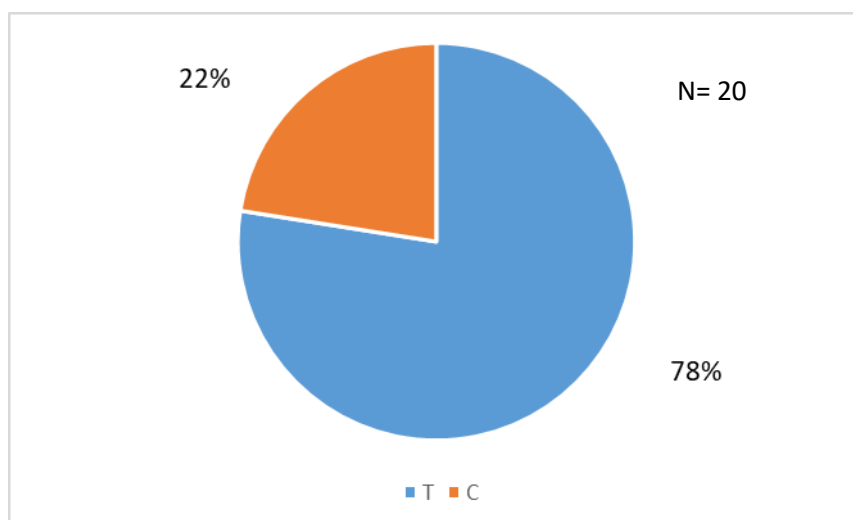


Figura 34: Frequência alélica do grupo controle em APOB rs1042034.

Para a posição em APOA rs964184, também foram realizadas as frequências genotípicas e alélicas tanto para os pacientes como para o grupo controle. Foi visto

que o duplo homozigoto C é mais prevalente na população estudada, presente em 69,7% (n=76) dos pacientes. Seguido do genótipo CG com 25,7% (n=28) e por último o GG com 4,6% (n=5) (**Figura 35**).

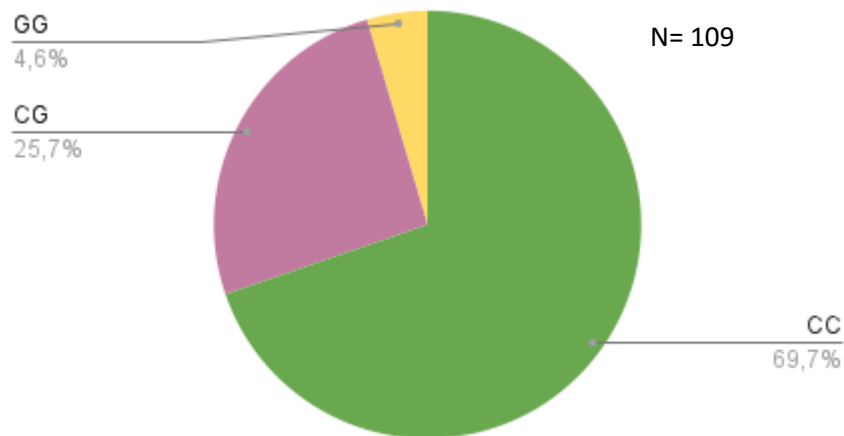


Figura 35: Frequência genotípica dos pacientes em APOA1 rs964184. Percentual dos genótipos CC (n= 76), CG (n=28) e GG (n=5) encontrados.

No grupo controle, a frequência foi parecida com a encontrada nos pacientes, sendo que o genótipo duplo homozigoto C foi o mais encontrado, em 66,7% dos indivíduos (n=12), e o genótipo heterozigoto CG foi visto em 33,3% (n=6). O genótipo GG não foi visto em nenhum dos participantes (**Figura 36**).

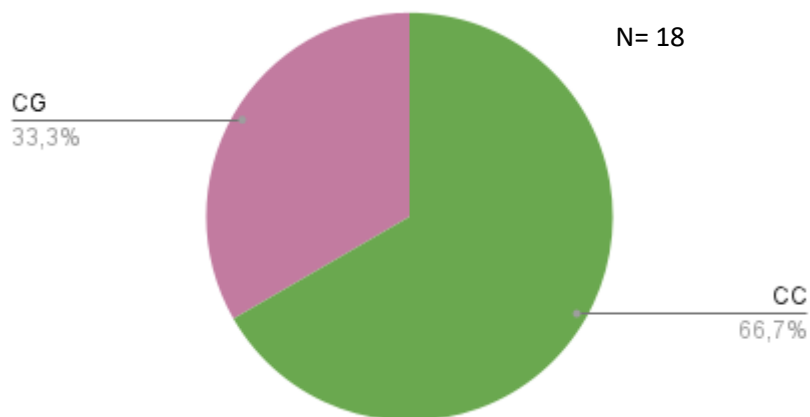


Figura 36: Frequência genotípica do grupo controle em APOA1 rs964184. Percentual dos genótipos CC (n=12) e GG (n=6) encontrados.

O cálculo de frequência alélica para os pacientes na posição APOA1 rs964184 foi realizado. Encontramos que o alelo C foi o mais prevalente na população, presente em 83% (n=90) dos indivíduos. O alelo G, por sua vez, está presente em 17% (n=19) dos pacientes (**Figura 37**).

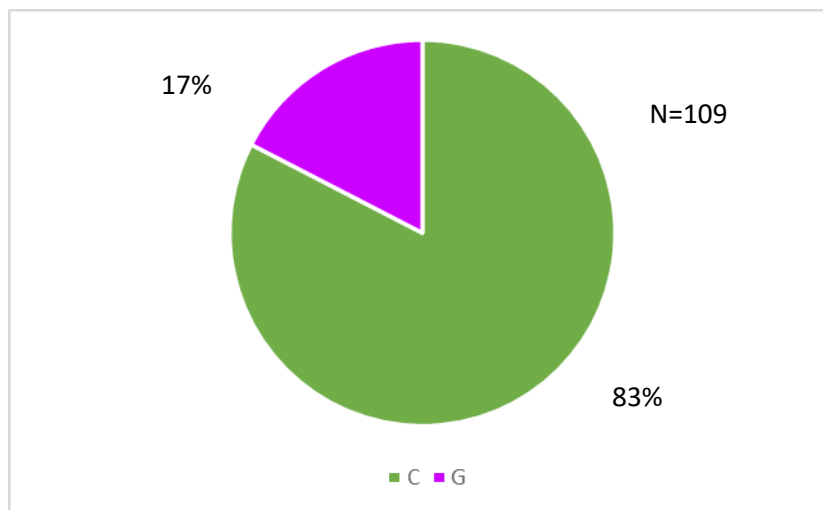


Figura 37: Frequência alélica dos pacientes em APOA1 rs964184.

Para o grupo controle, a frequência alélica foi bem parecida com a dos pacientes, onde observamos a predominância do alelo C em 83% (n=15) dos indivíduos. O alelo G apareceu em 17% (n=3) do grupo (**Figura 38**).

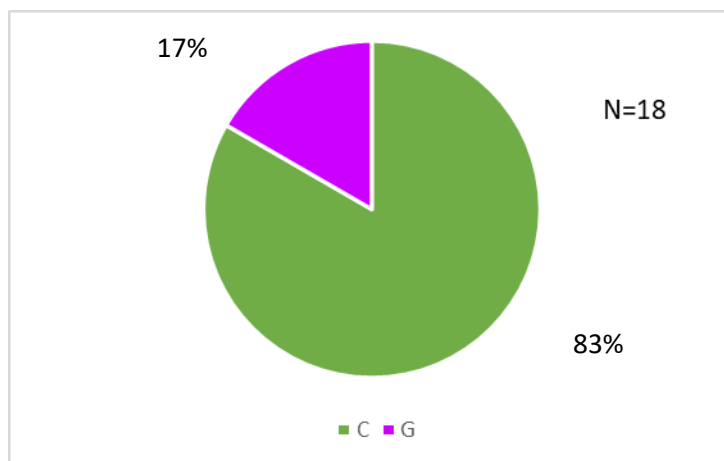


Figura 38: Frequência alélica do grupo controle em APOA1 rs964184.

Na frequência genotípica dos pacientes em LDLR rs5925 obtivemos resultados um pouco diferentes dos outros polimorfismos analisados. Foi observado que há um predomínio de genótipo heterozigoto CT em 51,9% (n=56) da população estudada. O segundo genótipo mais encontrado foi o duplo homozigoto TT com 36,1% (n=39) e último foi o duplo homozigoto CC com 12% (n=13) (**figura 39**).

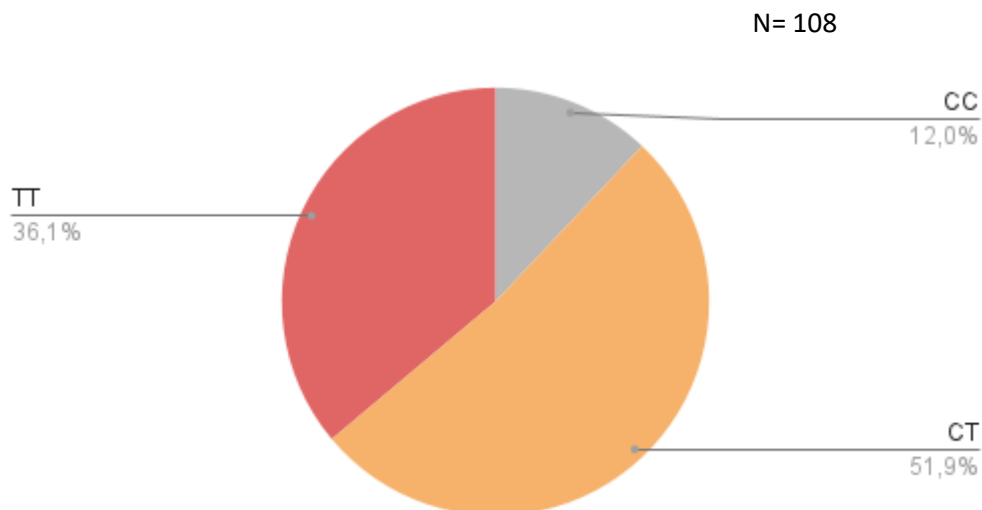


Figura 39: Frequência genotípica dos pacientes em LDLR rs5925. Percentual dos genótipos CC (n=13), CT (n=56) e TT (n=39) encontrados.

Na frequência genotípica do grupo controle, vimos resultados bem parecidos com o grupo de pacientes. Podemos observar que o genótipo heterozigoto CT foi o mais prevalente, encontrado em 47,4% (n=9) dos indivíduos. O duplo homozigoto TT foi o segundo mais visto na população, com 42,1% (n=8). O último foi o genótipo CC, encontrado apenas em 10,5% dos indivíduos (n=2) (**figura 40**).

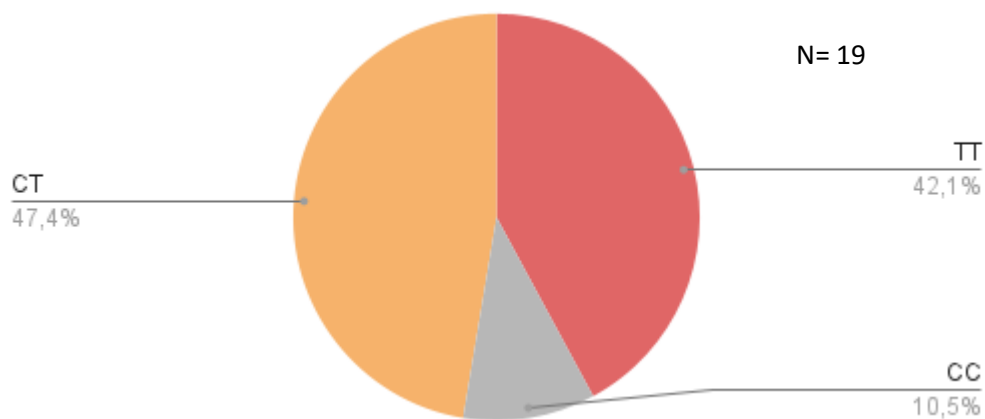


Figura 40: Frequência genotípica do grupo controle em LDLR rs5925. Percentual dos genótipos CC (n= 2), CT (n=9) e TT (n=8) encontrados.

A frequência alélica na posição LDLR rs5925 mostrou que o alelo T foi o mais prevalente (62%, n=90) no grupo de pacientes estudado. O alelo C foi visto em apenas 38% (n=19) dos indivíduos (**figura 41**).

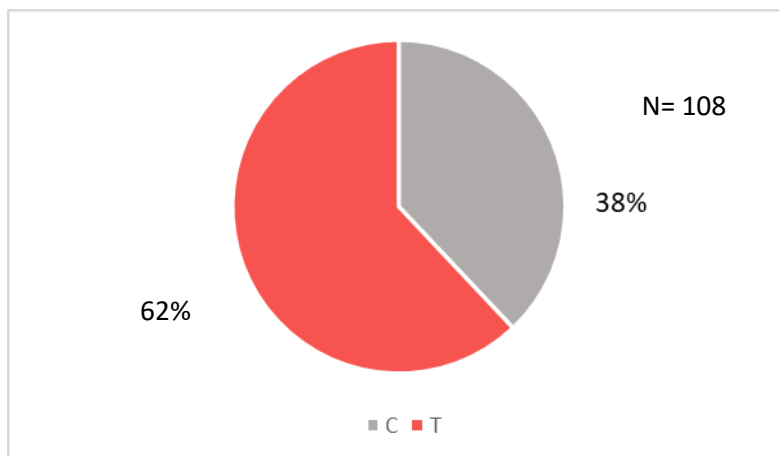


Figura 41: Frequência alélica dos pacientes em LDLR rs5925.

A frequência alélica do grupo controle seguiu o mesmo padrão dos pacientes. Encontramos o predomínio de alelo T em 66% (n=12) dos participantes. O alelo C foi visto em 34% (n=7) dos indivíduos (**figura 42**).

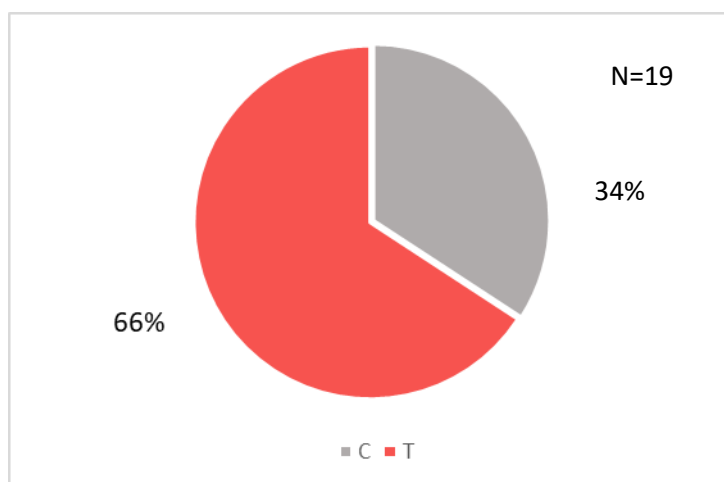


Figura 42: Frequência alélica do grupo controle em LDLR rs5925.

Foi realizada a análise estatística para verificar se havia diferença na frequência genotípica de cada polimorfismo estudado entre pacientes e controles. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

5.5 Associações dos genótipos com características clínicas por análises em tabela de contingência.

5.5.1 Para APOB rs1042034

Para investigar se existem associações dos genótipos de APOB rs1042034 e as características clínico-laboratoriais dos pacientes, foi utilizada a tabela de contingência que permite avaliar se há diferença significativa entre a distribuição dos genótipos nas diferentes características.

Para isto, foi utilizado o modelo aditivo que verifica a correlação entre todos os genótipos encontrados (CC x CT x TT). Já os modelos dominantes e recessivos fazem associações ao alelo associado à doença, no caso o alelo T (TT+ CT x CC) como dominante e o alelo C como recessivo (TT x CT + CC). As características utilizadas foram: Genótipo viral (dividido em Genótipo 1 e Genótipo 3), IMC (Normal x Elevado), Idade (+40 x -40), Gênero (Masculino x Feminino), diabetes, hipertensão, hemotransfusão e alcoolismo (Sim x Não).

Foi avaliada também a carga viral (Baixa x Alta) e resposta ao tratamento (RVS x NR+REC). Foi correlacionado também com o estado hepático do paciente, utilizando marcadores do perfil hepático como ALT e GGT (Normal x Elevado), grau de fibrose (Leve x Grave), cirrose pré e pós-tratamento (Sim X Não) e esteatose pós-tratamento (Sim x Não). Foi avaliado também se o grau de fibrose aumentou ou diminuiu durante o tratamento (Melhor x Pior ou igual). As dosagens lipídicas foram correlacionadas, pois a infecção viral interfere no metabolismo lipídico do hospedeiro e com isso, pode-se sugerir que determinado genótipo esteja influenciando para alterações nessas concentrações. Foram analisados o colesterol total, triglicerídeos, HDL-colesterol e LDL-colesterol, VLDL-colesterol e colesterol não HDL (Normal x Elevado). Os dados foram categorizados em duas variáveis e o valor de p considerado significativo foi $<0,05$ (Tabela 7).

Tabela 7: Correlações de contingência no SNP APOB rs1042034

APOB rs1042034	Modelo Aditivo (CC x CT x TT) *	Modelo Dominante (TT + CT x CC) **	Modelo Recessivo (CT+CC x TT) **
Características	p	p	p
Genótipo viral (1 x 3)	0,6268	>0,9999	0,7815

IMC (Normal x Elevado)	0,7734	0,6460	>0,9999
Idade (> 40 x ≤40)	0,5899	>0,9999	0,7463
Gênero (Masculino x Feminino)	0,5586	0,6422	0,3953
Diabetes (Sim x Não)	0,5615	>0,9999	0,5671
Hipertensão (Sim x Não)	0,8221	0,6420	0,8323
Hemotransfusão (Sim x Não)	0,4137	>0,9999	0,2455
Alcoolismo (Sim x Não)	0,9368	>0,9999	>0,9999
ALT (Elevado x Normal [#])	0,8209	0,5486	>0,9999
GGT (Elevado x Normal [#])	0,7248	>0,9999	0,8173
Grau de Fibrose pré- tratamento (Leve x Grave)	0,6934	>0,9999	0,6497
Cirrose pré-tratamento (Sim x Não)	0,5326	0,5548	0,8079
Carga Viral pré-tratamento (Baixa x Alta)	0,7528	0,6060	0,6755
Resposta ao tratamento (RVS x NR+REC)	0,9091	0,2970	0,8191
Grau de Fibrose pós- tratamento (Leve x Grave)	0,5500	>0,9999	0,5318
Resultado de Fibrose Pior (Melhor x Pior ou igual)	0,0579	>0,9999	>0,9999
Esteatose pós-tratamento (Sim x Não)	0,5450	0,5799	0,6079

Colesterol Total (Normal x Elevado)	0,6846	>0,9999	0,4824
Triglicerídeos (Normal x Elevado)	0,8307	>0,9999	0,8250
HDL (Normal x Elevado)	0,5354	>0,9999	0,5592
LDL (Normal x Elevado)	0,9008	>0,9999	0,8064
VLDL (Normal x Elevado)	0,6645	>0,9999	0,4902
Colesterol não HDL (Normal x Elevado)	0,9037	>0,9999	0,8061

*Teste Qui- quadrado; **Teste Exato de Fisher; ALT: alanina aminotransferase; GGT: gama glutamil transpeptidase; IMC: índice de massa corporal; NR: não-respondedor; REC: recidivante; RVS: respondedor viral sustentado; HDL: Lipoproteína de Alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade. #Critérios de valores normais definidos pelo Serviço de Hepatologia do HUCFF-UFRJ e não disponibilizados nos prontuários médicos.

Para o rs1042034 não foi encontrada diferença significativa para nenhuma das características analisadas em relação à distribuição dos diferentes genótipos.

5.5.2. Para APOA rs964184

Para investigar possíveis associações dos genótipos encontrados em rs964184 da APOA1 e as características de pacientes com HCV foi utilizada uma tabela de contingência que permite a avaliar se existe alguma diferença estatística entre a distribuição dos genótipos e as características clínico-laboratoriais e demográficas dos pacientes.

Foi utilizado o modelo aditivo (CC x CG x GG) para verificar se havia relação entre todos os genótipos. Para cada alelo foi utilizado o modelo dominante e recessivo, sendo o alelo G associado à doença (CG+GG x CC) e o modelo recessivo utilizando o alelo C (CC+CG x GG). As características utilizadas foram: Genótipo viral (dividido em Genótipo 1 e Genótipo 3), IMC (Normal x Elevado), Idade (+40 x -40), Gênero (Masculino x Feminino), diabetes, hipertensão, hemotransfusão e alcoolismo (Sim x Não).

Foi avaliada também a carga viral (Baixa x Alta) e resposta ao tratamento (RVS x NR+REC). Foi correlacionado também com o estado hepático do paciente, utilizando marcadores do perfil hepático como ALT e GGT (Normal x Elevado), grau de fibrose (Leve x Grave), cirrose pré e pós-tratamento (Sim x Não) e esteatose pós-tratamento (Sim x Não). Foi avaliado também se o grau de fibrose aumentou ou diminuiu durante o tratamento (Melhor x Pior ou igual). As dosagens lipídicas foram correlacionadas, pois a infecção viral interfere no metabolismo lipídico do hospedeiro. Foram analisados o colesterol total, triglicerídeos, HDL-colesterol e LDL-colesterol, VLDL-colesterol e colesterol não HDL (Normal x Elevado). Os dados foram categorizados em duas variáveis e o valor de *p* considerado significativo foi <0,05 (**tabela 8**).

Tabela 8: Correlações de contingência no SNP APOA1 rs964184

APOArs964184	Modelo Aditivo (CC x CG x GG) *	Modelo Dominante (CG+GG x CC) **	Modelo Recessivo (CC+CG x GG) **
Características	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
Genótipo viral (1 x 3)	0,4798	0,3834	>0,9999
IMC (Normal x Elevado)	0,4938	0,3454	0,6460
Idade (>40 x ≤40)	0,7390	>0,9999	>0,9999
Gênero (Masculino x Feminino)	0,5965	0,3704	0,6422
Diabetes (Sim x Não)	0,6933	0,5481	0,5079
Hipertensão (Sim x Não)	0,4980	0,4945	0,6420
Hemotransfusão (Sim x Não)	0,9603	>0,9999	>0,9999
Alcoolismo (Sim x Não)	0,8833	>0,9999	>0,9999
ALT (Elevado x Normal [#])	0,2679	0,1377	0,5486

GGT (Elevado x Normal [#])	0,7783	>0,9999	0,6108
Grau de Fibrose pré- tratamento (Leve x Grave)	0,2518	0,4713	0,1431
Cirrose pré-tratamento (Sim x Não)	0,5290	>0,9999	0,3163
Carga Viral pré-tratamento (Baixa x Alta)	0,0331*	0,0419*	>0,9999
Resposta ao tratamento (RVS x NR+REC)	0,1624	0,1516	0,6190
Grau de Fibrose pós- tratamento (Leve x Grave)	0,9623	>0,9999	>0,9999
Resultado de Fibrose Pior (Melhor x Pior ou igual)	0,8337	>0,9999	>0,9999
Esteatose pós-tratamento (Sim x Não)	0,1977	0,2870	0,5809
Colesterol Total (Normal x Elevado)	0,2240	0,6194	0,1200
Triglicerídeos (Normal x Elevado)	0,0340*	0,0301*	>0,9999
HDL (Normal x Elevado)	0,8895	>0,9999	0,5155
LDL (Normal x Elevado)	0,2085	0,4184	0,1129
VLDL (Normal x Elevado)	0,3678	0,1945	>0,9999
Colesterol não HDL (Normal x Elevado)	0,1724	0,7808	0,1017

*Teste Qui- quadrado; **Teste Exato de Fisher; ALT: alanina aminotransferase; GGT: gama glutamil transpeptidase; IMC: índice de massa corporal; NR: não-respondedor; REC: recidivante; RVS: respondedor viral sustentado; HDL: Lipoproteína de Alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade. [#]Critérios de valores normais definidos pelo Serviço de Hepatologia do HUCFF-UFRJ e não disponibilizados nos prontuários médicos.

Foi observado significância em duas características laboratoriais analisadas. A primeira delas foi a carga viral durante o pré-tratamento no modelo aditivo com $p=0,0331$. A partir disto, foram gerados gráficos para melhor visualização. Ambos estão dispostos como números de pacientes (eixo y) e genótipos (eixo X) que para o modelo aditivo apresentava os genótipos CC, CG e GG (**Figura 43**).

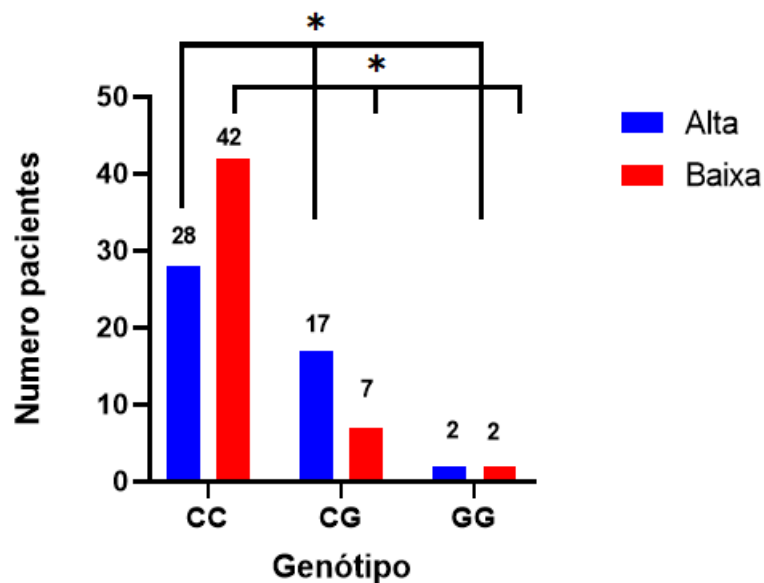


Figura 43: Frequência de genótipos em APOA1 rs964184 por carga viral com valor de p significativo (0,0331) no teste Qui-quadrado em modelo aditivo. Em vermelho, pacientes com carga viral baixa (menor que 600.000 U/mL) e em azul, pacientes com carga viral elevada antes do início do tratamento (maior que 600.000 U/mL). A linha em preto e o asterisco (*) indicam a significância estatística (Graphpad prism 8.0).

A partir dessa associação, foi realizado o teste em modelo recessivo e dominante, para saber qual alelo está envolvido nessa associação. O modelo dominante foi feito em associação ao alelo G associado à doença (GG+CG x CC) e foi encontrado significância estatística ($p=0,0419$). Foi gerado um gráfico para melhor visualização onde o eixo X são os genótipos e o eixo Y o número de pacientes (**figura 44**).

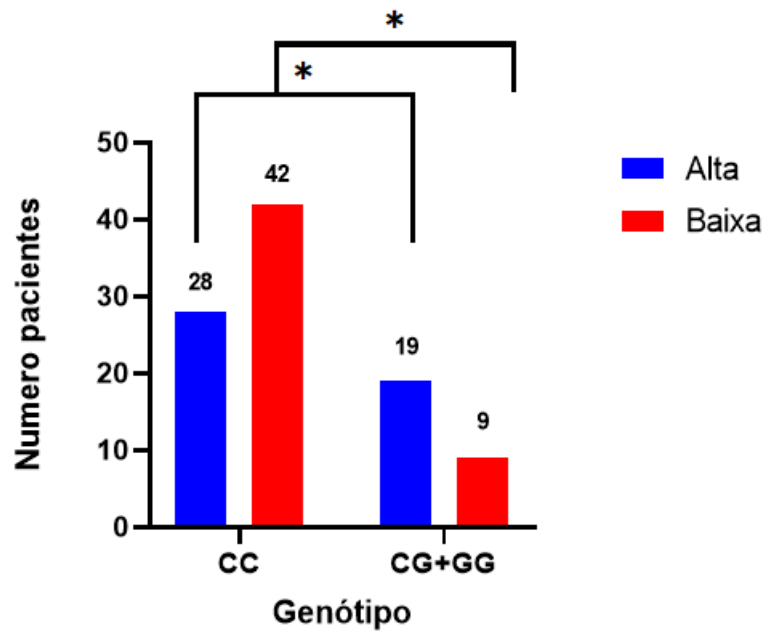


Figura 44: Frequência de genótipos em APOA1 rs964184 por carga viral com valor de p significativo (0,0419) no teste exato de Fisher em modelo dominante. Em vermelho, pacientes com carga viral baixa (menor que 600.000 Ui/mL) e em azul, pacientes com carga viral elevada antes do início do tratamento (maior que 600.000 Ui/mL). A linha em preto e o asterisco (*) indicam a significância estatística (Graphpad prism 8.0).

A segunda característica associada a APOA1rs964184 foram os triglicerídeos no modelo aditivo (CC x CG x GG) com $p=0,0340$. A partir daí, foi gerado um gráfico para melhor visualização, onde o eixo X corresponde aos genótipos e o eixo Y corresponde ao número de paciente (**figura 45**):

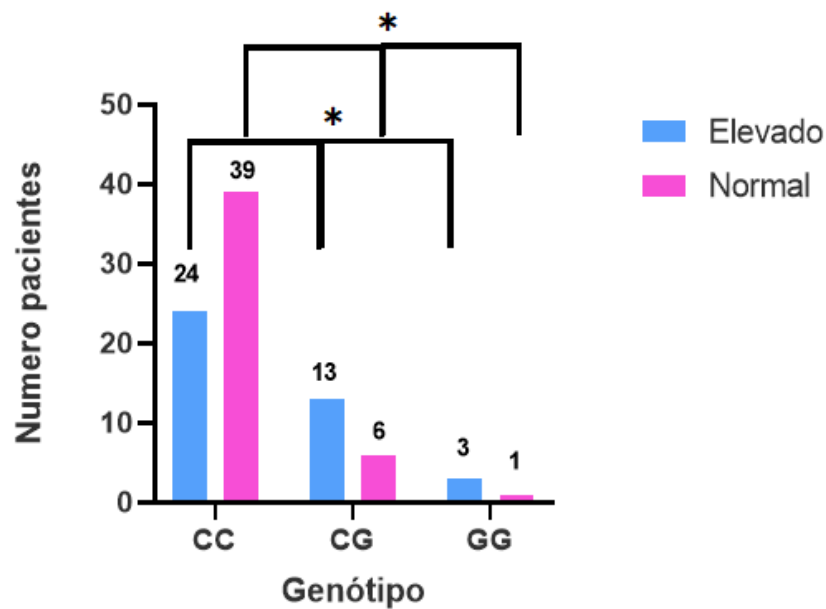


Figura 45: Frequência de genótipos em APOA1 rs964184 por concentração de triglicerídeos com valor de p significativo (0,0340) por teste Qui-quadrado no modelo aditivo. Em rosa, pacientes com triglicerídeos dentro dos valores de referência (menor que 175 mg/dL) e em azul, pacientes com triglicerídeos maior que o valor de referência. A linha em preto e o asterisco (*) indicam a significância estatística. (Graphpad prism 8.0).

A partir dessa correlação significativa entre os genótipos e os triglicerídeos no modelo aditivo, foi realizada a associação entre os modelos dominante e recessivo, sendo correlacionado ao alelo que interfere na doença (G). Observou-se uma significância em modelo dominante (CG+GG x CC) com valor de $p=0,0301$. Para melhor visualização, foi gerado um gráfico, onde o eixo X se refere aos genótipos e o eixo Y se refere ao número de pacientes (**figura 46**).

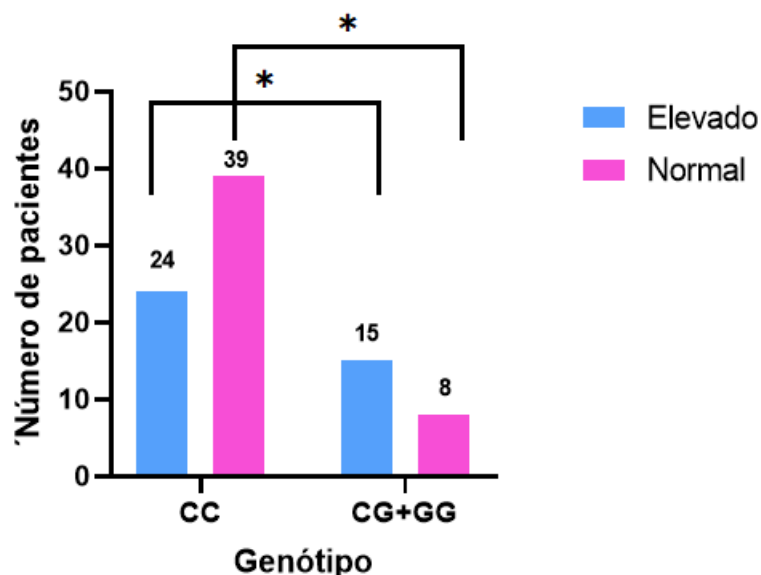


Figura 46: Frequência de genótipos em APOA1 rs964184 por concentração de triglicerídeos com valor de p significativo (0,0301) por teste exato de Fisher no modelo dominante. Em rosa, pacientes com triglicerídeos dentro dos valores de referência (menor que 175 mg/dL) e em azul, pacientes com triglicerídeos maiores que o valor de referência. A linha em preto e o asterisco (*) indicam a significância estatística (Graphpad prism 8.0).

5.5.3 Para LDLR rs5925

Para investigar as associações dos genótipos encontrados em rs5925 do LDLR e as características de pacientes com HCV foi utilizada uma tabela de contingência que permite a avaliar se existe alguma diferença estatística entre a distribuição dos genótipos e as características clínico-laboratoriais e demográficas dos pacientes.

Foi utilizado o modelo aditivo (CC x CT x TT) para verificar se havia relação entre todos os genótipos. Para cada alelo foi utilizado o modelo dominante e recessivo, sendo o alelo C associado a doença (TT x CT + CC) e o modelo recessivo utilizando o alelo T (CC x CT + TT). As características utilizadas foram: Genótipo viral (dividido em Genótipo 1 e Genótipo 3), IMC (Normal x Elevado), Idade (+40 x -40), Gênero (Masculino x Feminino), diabetes, hipertensão, hemotransfusão e alcoolismo (Sim x Não).

Foi avaliada também a carga viral (Baixa x Alta) e resposta ao tratamento (RVS x NR+REC). Foi correlacionado também com o estado hepático do paciente, utilizando marcadores do perfil hepático como ALT e GGT (Normal x Elevado), grau de fibrose (Leve x Grave), cirrose pré e pós-tratamento (Sim x Não) e esteatose pós-tratamento (Sim x Não). Foi avaliado também se o grau de fibrose aumentou ou diminuiu durante o tratamento (Melhor x Pior ou igual). As dosagens lipídicas foram correlacionadas pois a infecção viral interfere no metabolismo lipídico do hospedeiro. Foram analisados

o colesterol total, triglicerídeos, HDL-colesterol e LDL-colesterol, VLDL-colesterol e colesterol não HDL (Normal x Elevado). Os dados foram categorizados em duas variáveis e o valor de p considerado significativo foi $<0,05$ (**tabela 9**).

Tabela 9: Correlações de contingência no SNP LDLR rs5925

LDLR rs5925	Modelo Aditivo (CC x CT x TT) *	Modelo Dominante (TT x CT+CC) **	Modelo Recessivo (TT + CT x CC) **
Características	p	p	p
Genótipo viral (1 x 3)	0,1151	0,1173	0,1452
IMC (Normal x Elevado)	0,8011	0,7343	$>0,9999$
Idade (> 40 x ≤ 40)	0,4410	0,3520	$>0,9999$
Gênero (Masculino x Feminino)	0,7739	0,5462	$>0,9999$
Diabetes (Sim x Não)	0,7742	$>0,9999$	0,5745
Hipertensão (Sim x Não)	0,5339	0,7480	0,4063
Hemotransfusão (Sim x Não)	0,4512	0,7320	0,2550
Alcoolismo (Sim x Não)	0,7483	$>0,9999$	$>0,9999$
ALT (Elevado x Normal [#])	0,2124	0,6809	0,2383
GGT (Elevado x Normal [#])	0,2421	0,5085	0,2502
Grau de Fibrose pré- tratamento (Leve x Grave)	0,7429	0,7362	0,8204
Cirrose pré-tratamento (Sim x Não)	0,8053	0,7190	0,8106
Carga Viral pré-tratamento	0,0868	0,6778	0,5309

(Baixa x Alta)			
Resposta ao tratamento (RVS x NR+REC)	0,7874	0,7400	0,8251
Grau de Fibrose pós- tratamento (Leve x Grave)	0,2298	0,1797	0,7374
Resultado de Fibrose Pior (Melhor x Pior ou igual)	0,9764	>0,9999	>0,9999
Esteatose pós-tratamento (Sim x Não)	0,1829	>0,9999	0,1179
Colesterol Total (Normal x Elevado)	0,6417	0,5076	0,4920
Triglicerídeos (Normal x Elevado)	0,0052**	0,0021**	0,1856
HDL (Normal x Elevado)	0,2116	0,1978	>0,9999
LDL (Normal x Elevado)	0,4324	0,3021	0,3442
VLDL (Normal x Elevado)	0,0138*	0,0020**	0,6449
Colesterol não HDL (Normal x Elevado)	0,5570	0,4713	0,4663

*Teste Qui- quadrado; **Teste Exato de Fisher; ALT: alanina aminotransferase; GGT: gama glutamil transpeptidase; IMC: índice de massa corporal; NR: não-respondedor; REC: recidivante; RVS: respondedor viral sustentado; HDL: Lipoproteína de Alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade. #Critérios de valores normais definidos pelo Serviço de Hepatologia do HUCFF-UFRJ e não disponibilizados nos prontuários médicos.

Foi observada uma significância estatística entre os genótipos e duas características clínicas dos pacientes. A primeira delas foi em relação aos triglicerídeos dos pacientes que no modelo aditivo (CC x CT x TT), o valor de *p* foi 0,0052. Um gráfico foi gerado para melhor visualização, onde no eixo X encontra-se os genótipos e no eixo Y corresponde ao número de pacientes (**figura 47**).

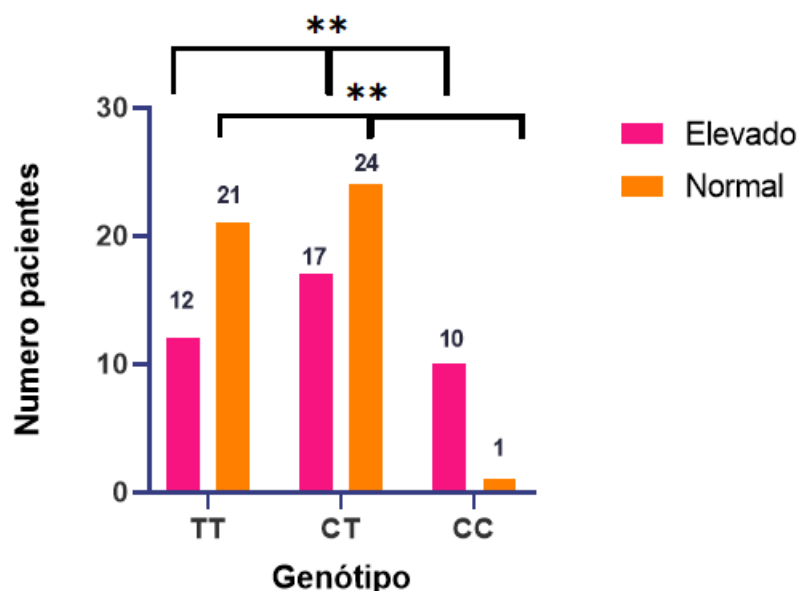


Figura 47: Frequência de genótipos de LDLR rs5925 por triglicerídeos com valor de p significativo (0,0052) por teste Qui-quadrado no modelo aditivo. Em laranja, pacientes com triglicerídeos dentro dos valores de referência (menor que 175 mg/dL) e em rosa, pacientes com triglicerídeos maiores que o valor de referência. A linha em preto e o * indicam a significância estatística. Feito com Graphpad Prism 8.0.

A partir da correlação significativa entre os genótipos de LDLR rs5925 e os triglicerídeos no modelo aditivo, fomos verificar qual era o alelo que estava influenciando essa associação. Desta forma, foi realizada a análise em modelo dominante e recessivo, onde o recessivo (CT+CC x TT) foi correlacionado de maneira significativa ($p= 0,0021$). A partir disso, foi gerado um gráfico para melhor visualização, onde o eixo X corresponde aos genótipos e o eixo Y o número de pacientes (**figura 48**).

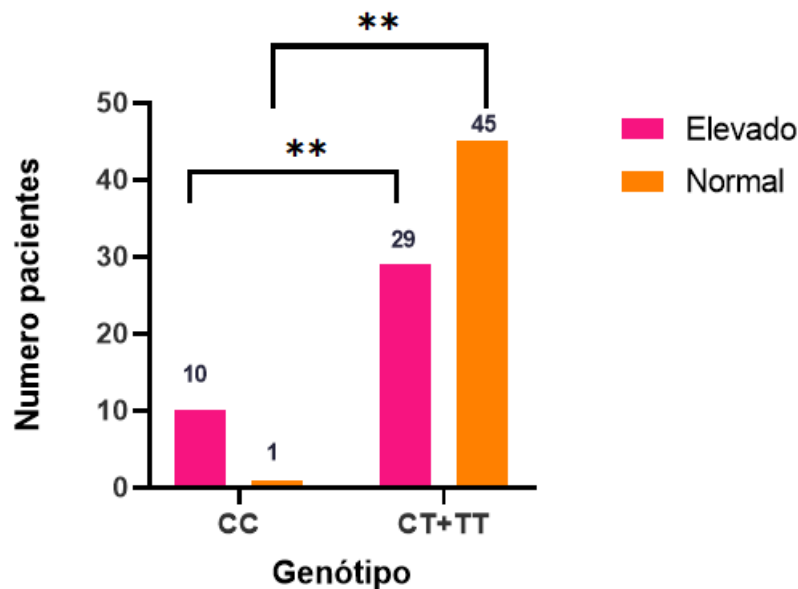


Figura 48: Frequência de genótipos em LDLR rs5925 por triglicerídeos com valor de p significativo (0,0021) por teste exato de Fisher no modelo dominante. Em laranja, pacientes com triglicerídeos dentro dos valores de referência (menor que 175 mg/dL) e em rosa, pacientes com triglicerídea maior que o valor de referência. A linha em preto e o ** indicam a significância estatística ($p < 0.05$). Feito com Graphpad Prism 8.0.

A segunda característica que foi associada ao polimorfismo em LDLRrs5925 foi VLDL no modelo aditivo (CC x CT x TT) com p significativo=0,0138. Foi gerado um gráfico para melhor visualização, onde o eixo X se refere aos genótipos e o eixo Y corresponde ao número de pacientes (**figura 49**).

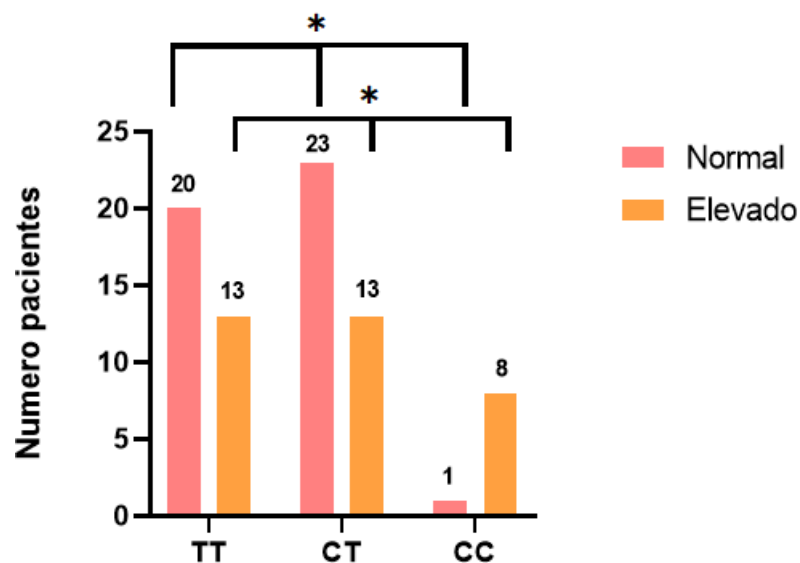


Figura 49: Frequência de genótipos em LDLR rs5925 por VLDL com valor de p significativo (0,0138) por teste Qui-quadrado no modelo aditivo. Em laranja, pacientes com VLDL acima dos valores de referência (maior que 30 mg/dL) e em rosa, pacientes com VLDL menor que o valor de referência. A linha em preto e o * indicam a significância estatística. Feito com Graphpad Prism 8.0.

Após a associação em modelo aditivo ter dado resultado significativo, foi realizada a associação entre alelos em modelo recessivo e dominante para saber qual que estavam influenciando a correlação. O modelo recessivo (CT+ CC x TT) mostrou significância estatística com $p=0,0020$ e um gráfico foi gerado para a melhor visualização. O eixo X corresponde aos genótipos e o eixo Y ao número de pacientes (figura 50).

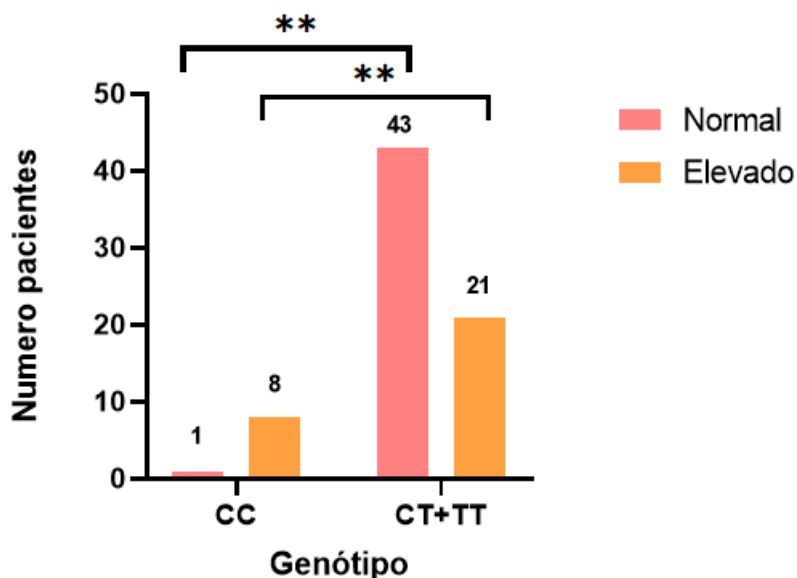


Figura 50: Frequência de genótipos em LDLR rs5925 por VLDL com valor de p significativo (0,0020) por teste exato de Fisher no modelo dominante. Em laranja, pacientes com VLDL acima dos valores de referência (maior que 30 mg/dL) e em rosa, pacientes com VLDL menor que o valor de referência. A linha em preto e o ** indicam a significância estatística. Feito com Graphpad Prism 8.0.

5.6 Análise de correlação de múltiplas variáveis entre características clínico-laboratorial e demográficos e os polimorfismos em APOB rs1042034, APOA1 rs964184 e LDLR rs5925

Para a análise de correlações com múltiplas variáveis foram utilizadas as características clínicas que obtivemos dos prontuários assim como os valores das dosagens lipídicas efetuadas e o alelo associado à doença, no caso do APOB rs1042034 o alelo utilizado foi o T, para APOA1 rs964184 foi utilizado o alelo G e para o LDLR rs5925 foi utilizado o alelo C.

Os dados tiveram que ser transformados em números, pois no programa não é possível colocar dados categóricos. Dessa forma, cada variável foi transformada em respostas como “sim” e “não” e foram binarizados entre 1 e 0 (sim e não, respectivamente). Foi gerado um mapa de calor (*heatmap*) que determina o quanto aquela característica se correlaciona com a outra através do grau de intensidade da cor. Os valores de correlação mais próximos de +1 indicam uma correlação positiva bem forte (indicados pela cor vermelha) e os valores mais próximos de -1 indicam uma correlação negativa mais forte (indicados pela cor azul) (**figura 51**).

Foram encontradas algumas correlações positivas e negativas que foram apresentadas em tabelas, onde seus respectivos valores de Pearson e *p* foram devidamente exibidos (tabela 9 e 10). A partir disso, foi feito também um mapa de calor dos valores de *p* de modo que quanto maior a intensidade da cor azul, mais os resultados se aproximam de 0, ou seja, são mais significativos (**figura 52**).

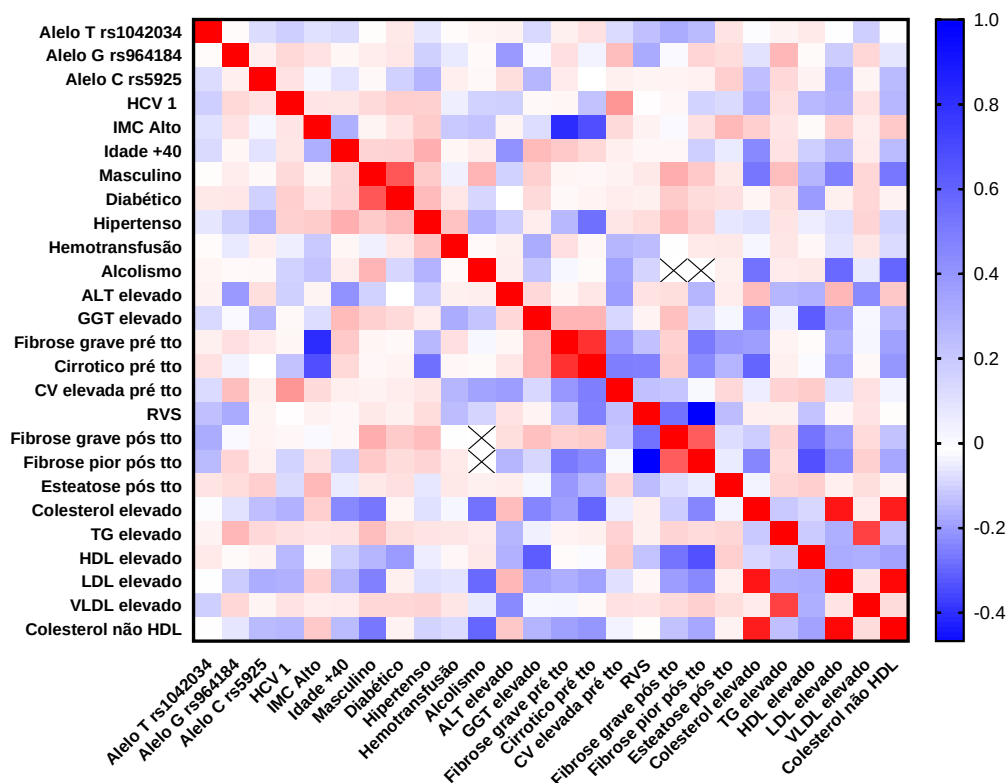


Figura 51: Mapa de calor da matriz de correlação com o valor *r* de Pearson. Quanto maior a intensidade da cor vermelha, mais forte a correlação positiva (0 a +1) entre as características avaliadas. Quanto maior a intensidade da cor azul, mais forte a correlação negativa (0 a -0,4). O X representa a falta de dados naquela determinada característica (Graphpad Prism 8.0).

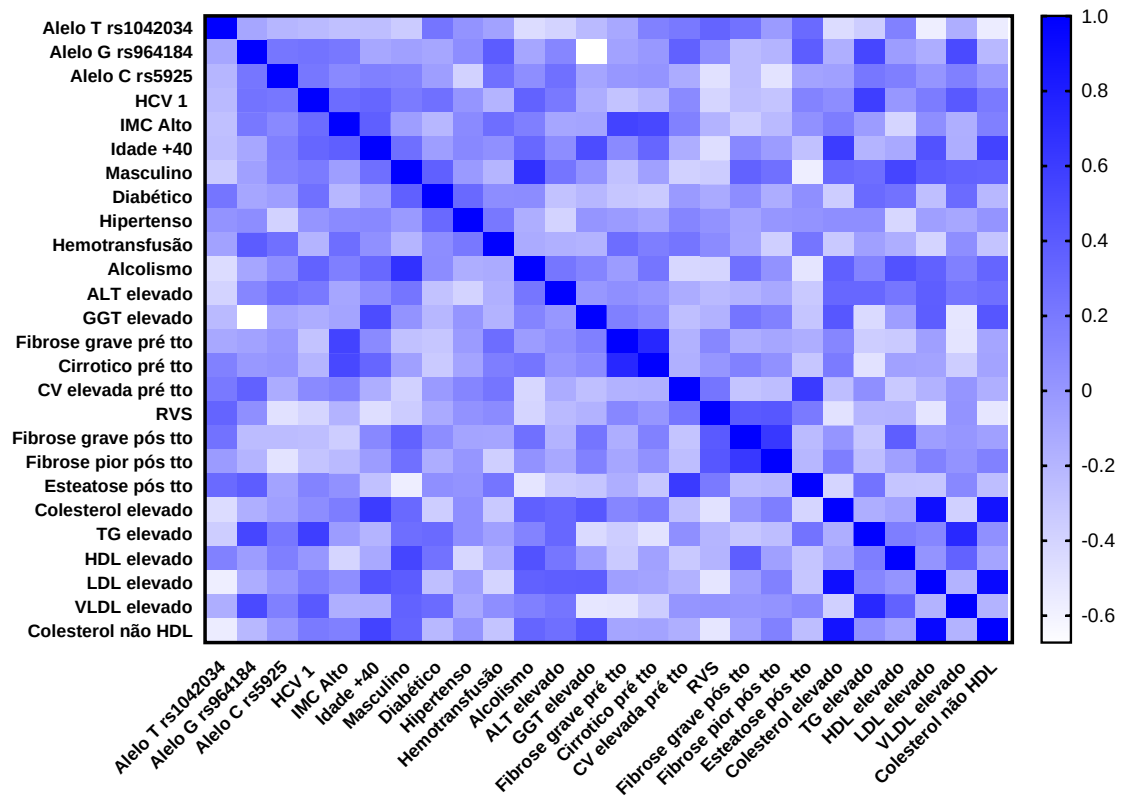


Figura 52: Mapa de calor da matriz de correlação com valores de p. Quanto mais forte a cor azul, mais próximo de 0 é o valor de p e mais significativo é a correlação. Feito com Graphpad Prism 8.0.

Tabela 10: Correlações positivas significativas entre as características avaliadas.

Correlação positiva	Valor de Pearson (r)	Valor p
Alelo G rs964184 x triglicerídeo elevado	0,279	0,009
Carga viral elevada pré-tratamento x HCV1	0,408	<0,05 (3,02858817375906e-005)
Idade +40 x Hipertensão	0,3126	0,0019
Diabetes x Masculino	0,6561	<0,05 (1,25677246387568e-013)

Hipertensão x Masculino	0,2891	0,0035
Hipertensão x Diabetes	0,2662	0,0074
Fibrose grave pós-tratamento x Fibrose pior pós tratamento	0,6326	<0,05 (5,96021677079506e-005)
Triglicerídeo elevado x VLDL elevado	0,7429	<0,05 (4,44089209850063e-015)

Tabela 11: Correlações significativas negativas entre as características avaliadas.

Correlação negativa	Valor de Pearson (r)	Valor p
IMC Alto x Fibrose grave pré-tratamento	-0,3871	<0,05 (3,56885053104605e-004)
IMC Alto x Cirrose pré-tratamento	-0,3223	0,0027
RVS x Fibrose pior após o tratamento	-0,2581	0,0046

Foram encontradas correlações positivas entre o alelo G rs964184 e os níveis de triglicerídeos no modelo de comparações múltiplas, assim como já havia sido encontrado na tabela de contingência no modelo dominante. Foi vista relação entre o genótipo viral 1 x carga viral pré-tratamento e fibrose grave pós-tratamento x fibrose pior pós-tratamento. Além disso, outras características como idade +40 x hipertensão, diabetes x gênero masculino e diabetes x hipertensão também foram correlacionadas positivamente. Da mesma forma, alterações no metabolismo lipídico, como triglicerídeos elevado x VLDL elevado.

Em relação às correlações negativas foram vistos IMC alto x fibrose grave pré-tratamento, IMC alto x cirrose pré-tratamento e RVS x fibrose pior pós-tratamento.

6. Discussão

Neste trabalho foram avaliadas as frequências genótípicas e alélicas de determinados SNPs, bem como a associação desses com características clínico-laboratoriais e demográficas de uma coorte composta por 109 pacientes com hepatite C crônica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ. Foram avaliados polimorfismos gênicos em APOB rs1042034, APOB rs676210, APOA1 rs964184 e LDLR rs5925 envolvidos no metabolismo lipídico do hospedeiro e como a presença deles pode influenciar na infecção pelo HCV. Além de pacientes com hepatite C crônica, foram avaliados 20 indivíduos controle sem hepatite C.

Inicialmente, investigaríamos quatro polimorfismos, entretanto, ao buscar na literatura, foi visto que em APOB rs1042034 e APOB rs676210 havia um forte desequilíbrio de ligação, o que significa que dois alelos estão em associação não aleatória em diferentes regiões cromossômicas, podendo servir de substitutos um dos outros (SLAKTIN, 2008; BENN, 2009; HARADA *et al.*, 2018). Dessa forma, foram realizadas algumas genotipagens para verificar essa informação e na **figura 30** é verificado que o mesmo paciente que tinha o genótipo TT para o rs1042034 tinha o genótipo GG para APOB rs676210, bem como o que tinha genótipo CC para rs1042034, tinha o AA para o rs676210 e o que tinha o genótipo CT para rs1042034, tinha o genótipo GA para o rs676210, sugerindo assim o desequilíbrio. A partir deste ponto, seguimos apenas com o polimorfismo em rs1042034 na APOB.

Foram realizadas as frequências genótípicas e alélicas da população de estudo e da população controle. Foi visto que para o polimorfismo em APOB rs1042034 as frequências genótípicas encontradas nos pacientes foram de 67,0% para o genótipo TT, 29,4% para o genótipo CT e 3,7% para o genótipo CC (**figura 31**). No grupo controle foram encontradas frequências semelhantes, de 60% genótipo TT, 35% genótipo CT e 5% genótipo CC (**figura 32**). A frequência alélica dos pacientes e controles também foram similares, foram encontrados 82% e 78% para o alelo T e 18% e 22% para o alelo C, respectivamente (**figuras 33 e 34**). A frequência alélica encontrada no banco de dados SNPdb do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para a população latino-americana é de 78,64% para o alelo T e 21,36% para o alelo C. A frequência global desses alelos é de 62,96% para o alelo T e 37,04% para o alelo C (SNPdb, 2024). Dessa forma, a frequência alélica encontrada no estudo, corrobora com o descrito no banco de dados.

Para o polimorfismo em APOA1 rs964184 foram encontradas frequências genótípicas de 69,7% de genótipo CC, 25,7% de genótipo CG e 4,6% de genótipo GG

(**figura 35**). Para a população controle foram encontrados 66,7% do genótipo CC e 33,3% do genótipo GG, sendo assim, não foram encontrados controles com genótipo CG (**figura 36**). No entanto, essa discrepância de genótipos de APOA1 rs964184 entre pacientes e controles deve ser mais bem analisada, a partir da inclusão de um número maior de indivíduos controles. A frequência alélica que obtivemos para ambos os grupos foram de 83% do alelo C e 17% do alelo G (**figuras 37 e 38**). De acordo com o banco de dados SNPdb, a frequência de alelo C na população latino-americana é de 79,80% e do alelo G é de 20,20%. A frequência global disponibilizada é de 77,78% para o alelo C e para o alelo G é de 22,22% (SNPdb, 2024). Contudo, apesar de observarmos que o alelo C é mais prevalente na nossa população assim como no banco de dados, existe uma pequena discrepância entre a frequência alélica encontrada no estudo daquela descrita no banco de dados SNPdb.

Para o polimorfismo em LDLR rs5925 foram encontradas frequências genotípicas de 36,1% TT, 51,9% CT e 12,0% CC (**figura 39**). Para o grupo controle foram encontradas frequências de 42,1% do genótipo TT, 47,4% do genótipo CT e 10,5% do genótipo CC (**figura 40**). Como frequência alélica obtivemos 62% e 66% do alelo T na população estudada e no controle, respectivamente, e para o alelo C 38% e 34% para os pacientes e controles (**figuras 41 e 42**). No banco de dados SNPdb, a frequência alélica desse SNP na população latino-americana é de 62,34% para o alelo T e 37,66% para o alelo C. A frequência alélica global é de 66,41% para o alelo T e 33,59% para o alelo C (SNPdb, 2024). Sendo assim, foi encontrada uma concordância entre as frequências alélicas da população estudada com o banco de dados.

Como já mencionado anteriormente, observamos e comparamos as frequências esperadas e já descritas no banco de dados e verificamos uma similaridade entre as frequências encontradas neste trabalho com as da população da América do Sul e do mundo. Entretanto, se fazem necessários mais estudos com indivíduos brasileiros, pois o Brasil é um país de alta diversidade genética (SOUZA *et al.*, 2019).

A avaliação das frequências genotípicas e alélicas mencionadas acima é extremamente relevante na história natural da hepatite C devido à interação do vírus com o metabolismo lipídico do hospedeiro (ELGRETLI *et al.*, 2023). Já foi demonstrado que a APOB e LDLR foram correlacionadas com susceptibilidade à infecção pelo HCV (HARADA *et al.*, 2018; REAL *et al.* 2019). Em relação a APOA1, foi visto que está relacionada com a diminuição de RNA viral em experimento *in vitro* (MANCONE *et al.*, 2010). Além disso, alguns autores associam o polimorfismo em APOA1 com alterações no metabolismo lipídico (QIU *et al.*, 2018; BRAUN *et al.*, 2012).

As alterações no metabolismo lipídico podem gerar um quadro de dislipidemia que é caracterizada como mudanças na concentração de lipídeos no sangue e acúmulo de uma ou mais lipoproteínas (ZHANG *et al.*, 2019). A progressão da infecção pelo HCV modula vias de biossíntese de lipídeos e reduz a β -oxidação, induzindo um desbalanço homeostático, aumentando os níveis de colesterol total e triglicerídeos no sangue (SAYED *et al.*, 2010). Dessa forma, ocorre maior síntese de triacilglicerol (TAG) e ésteres de colesterol, responsáveis pela formação de gotículas lipídicas (*lipids droplets*), que são essenciais para o brotamento viral (TARGETT-ADAMS *et al.*, 2017). O acúmulo de lipídeos também aumenta a formação de lipoproteínas responsáveis pelo carregamento de triglicerídeos e colesterol endógenos. A porção proteica dessas lipoproteínas, principalmente a APOB, favorece a montagem da partícula viral (BASSENDINE, 2011).

Nos últimos anos, a busca por marcadores genéticos associados com a infecção pelo HCV tem sido amplamente estudada (TANAKA *et al.*, 2009). Os polimorfismos em IL28B rs8099917 e rs12979860 foram associadas à resposta ao tratamento com PEG-INF + RBV (LIN *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2012). Os polimorfismos em APOE rs7412 e rs429358 tiveram relação encontrada com o agravamento da fibrose (CHIBA – FALEK *et al.*, 2012). Dessa forma, neste estudo, foram realizadas associações dos polimorfismos em APOB rs1042034, APOA1 rs964184 e LDLR rs5925 com diversos parâmetros em pacientes com hepatite C crônica, a fim de ampliar o estudo desses polimorfismos nesta doença.

Para o polimorfismo em APOB rs1042034, neste estudo, não foram encontradas associações significativas com as características clínicas e demográficas dos pacientes com hepatite C (**tabela 7**). Este polimorfismo já foi associado com alterações lipídicas em pacientes infectados por HCV. Essa observação foi encontrada para pacientes que carregam o genótipo TT e que apresentavam níveis séricos de LDL-colesterol mais baixos, podendo se tornar facilitador da propagação viral. Isto porque níveis mais baixos de LDL no sangue podem significar que ocorre uma mudança de afinidade e interação da LDL pelo seu receptor (LDLR), permitindo que os hepatócitos captem mais LDL acoplada a LPV para dentro do fígado e o vírus possa se replicar e propagar (HARADA *et al.*, 2018). Nesse mesmo estudo, foi visto que os pacientes que carregam o alelo T nessa variante possuíam triglicerídeos elevados. Esta associação já foi relatada no estudo de JOHANSEN *et al.* (2011) no qual o alelo T era mais frequente em indivíduos com hipertrigliceridemia, sugerindo que, de forma ainda não esclarecida, esses polimorfismos podem alterar esta apolipoproteína, facilitando uma elevação na concentração plasmática de triglicerídeos (JOHANSEN *et al.*, 2011).

Ainda em relação a este polimorfismo, foram encontrados resultados divergentes entre as frequências alélicas de diferentes grupos étnicos com níveis de lipídeos (ZHANG *et al.*, 2019; EDMONDSON, 2011; BRYANT, 2013). Com isso, pode-se concluir que a associação entre SNP em rs1042034 pode ter especificidade racial, étnica e com o gênero (ZHANG *et al.*, 2019).

Como não encontramos nenhuma associação deste polimorfismo com nenhuma das características testadas dos pacientes infectados pelo HCV, uma hipótese para isso pode ser devido ao fato de o Brasil ser um país miscigenado, composto por vários grupos étnicos desde o seu descobrimento (SOUZA *et al.*, 2019).

Para o polimorfismo em APOA1 rs964184 foram encontradas associações entre os genótipos e o nível viral circulante (carga viral) pré-tratamento dos pacientes. Foi visto que indivíduos com o genótipo CC apresentavam cargas virais mais baixas do que pacientes com o genótipo GG e CG (**figura 43**). Ao associar o alelo G como de risco à doença, foi visto que pessoas com o alelo C apresentam carga viral mais baixa do que aqueles com alelo G (**figura 44**). Estes dados sugerem que possa haver uma influência do alelo C sob a carga viral.

Além disso, também foram observadas associações entre os genótipos dos pacientes e suas concentrações séricas de triglicerídeos. Foi visto que pessoas que têm o genótipo CC possuem triglicerídeos mais baixos do que pessoas com genótipos CG e GG (**figura 45**). Por isso, foi feita uma associação entre os alelos e os triglicerídeos e foi visto que o alelo C está associado com níveis normais de triglicerídeos, enquanto o alelo G com níveis mais elevados (**figura 46**). Este achado corrobora o estudo de QIU *et al.* (2018) e BRAUN *et al.* (2012) que encontraram associação entre os níveis elevados de triglicerídeos em portadores do alelo G.

Na literatura não foram encontrados dados da relação direta entre o polimorfismo em APOA1 rs964184 com o HCV. Entretanto, a proteína APOA1 já foi associada com a replicação do HCV, onde foi observada uma redução de APOA1 em partículas de LDL nos pacientes com hepatite C (MANCONE *et al.*, 2010). O autor utilizou modelo *in vitro* com a linhagem Rep60 silenciada para APOA1 (por pequeno RNA de interferência - siRNA) e transfectada com replicon subgenômico e observou uma redução nos níveis de RNA-HCV e da proteína NS5A do HCV, essencial para a replicação viral (MANCONE *et al.*, 2010).

O LDLR é o receptor de membrana da lipoproteína LDL, responsável por mediar a endocitose e internalizar ligantes extracelulares para o meio intracelular, como por exemplo, partículas de lipoproteínas com colesterol circulante (GO, GW & MANI, A, 2012). O HCV utiliza-se desse receptor para penetrar no hepatócito e iniciar seu ciclo replicativo (ZAPATERO-BELINCHÓN *et al.*, 2021; AGNELLO *et al.*, 1999).

Dessa forma, se torna importante o estudo de polimorfismos neste receptor para investigar seu papel na infecção por HCV.

Para o polimorfismo em LDLR rs5925 foi observada associação entre a frequência genotípica e alélica dos pacientes com hepatite C e o nível sérico de triglicerídeos e VLDL. A maioria dos pacientes com o genótipo TT e CT tem níveis dentro da faixa de normalidade enquanto pacientes com o genótipo CC apresentam níveis elevados (**figura 47 e figura 49**). Foi visto que os pacientes que carregam o alelo T possuem triglicerídeos mais baixos, em relação a quem tem o alelo C (**figura 48 e figura 50**). Este resultado está de acordo com o encontrado por ROJAS *et al.* (2019), que também verificou que pessoas que possuíam o alelo T em seu genótipo tinham níveis não só de triglicerídeos mais baixos, mas também de colesterol total e LDL. Em relação à VLDL, não foram encontrados artigos que associam os genótipos do polimorfismo em LDLR rs5925 com essa lipoproteína. No entanto, bioquimicamente sabe-se que VLDL é composta por 90% de lipídeos e 10% de proteínas, e os triglicerídeos fazem parte de 70% da massa do VLDL, dessa forma, quanto mais triglicerídeos estiver no indivíduo, maior a quantidade de VLDL (PACKARD *et al.*, 2020; JUAREZ-CASSO & FARZAM, 2022).

Por outro lado, foi visto na literatura que o polimorfismo em LDLR rs5925 foi associado à susceptibilidade à infecção pelo HCV (REAL *et al.*, 2019), onde foi verificado que o indivíduo que carrega o alelo C tem maior susceptibilidade ao vírus do que quem carrega o alelo T e que isso pode ter uma importante relação com o metabolismo lipídico. Por outro lado, Lil *et al.* (2006) encontrou que o alelo C era mais prevalente em pessoas com RNA-HCV negativo e o alelo T era o mais predominante em pessoas com hepatite C crônica, sugerindo que esse polimorfismo pode estar relacionado à susceptibilidade viral, mostrando dados contraditórios entre os estudos. HARADA *et al.* (2018), por sua vez, não encontrou nenhuma associação entre esse polimorfismo e pacientes com HCV. Desta forma, observamos dados controversos na literatura, sendo necessários mais estudos para melhor entender o papel deste polimorfismo na infecção pelo HCV.

Durante as análises de correlações múltiplas foram encontradas diversas associações positivas (**figura 51 e tabela 10**) e negativas (**figura 52 e tabela 11**) entre as características analisadas e o alelo considerado de risco para o HCV. O alelo G do polimorfismo em APOA1 rs964184 obteve uma correlação positiva com triglicerídeos elevados, como foi visto também na análise por tabela de contingência. Como já citado anteriormente, alguns artigos corroboraram com essa associação em portadores do alelo G e níveis séricos de triglicerídeos acima dos valores de referência (QIU *et al.* 2018; BRAUN *et al.*, 2012). Outra correlação positiva foi vista entre o genótipo viral 1 e

carga viral pré-tratamento elevada. Este dado é corroborado por SORIANO *et al.* (2008) e CHAKRAVARTI *et al.* (2011) que encontraram que pacientes com hepatite C crônica que possuíam genótipo 1 apresentavam níveis de RNA de HCV mais elevados.

Além das correlações com a infecção viral, foram observadas outras correlações positivas como: hipertensão com sexo masculino, idade +40 e diabetes, diabetes com sexo masculino. No entanto, essas associações precisam ser mais bem avaliadas, pois são patologias multifatoriais que precisam de mais caracterizações.

Ao avaliar a fibrose inicial e 10 anos após o acompanhamento dos pacientes (n=38) observamos que alguns pacientes regrediram e outros progrediram o grau de fibrose. Não foi encontrada associação dessa correlação com os polimorfismos. A última correlação positiva encontrada foi entre os triglicerídeos elevados x VLDL elevada. Como já dito anteriormente, a VLDL tem uma importante associação com o nível sérico de triglicerídeos, sendo que quanto mais triglicerídeos disponíveis, mais intensa é a síntese de VLDL, que é uma grande aliada do HCV, permitindo a formação da partícula viral (JUAREZ-CASSO & FARZAM, 2022; GRASSI *et al.*, 2016).

Em nosso trabalho também foram vistas algumas correlações negativas, sendo elas: resposta virológica sustentada (RVS) x e progressão no grau de fibrose (grau de fibrose pior), IMC alto x fibrose pré-tratamento; e IMC alto x cirrose pré-tratamento.

O tratamento antiviral busca a obtenção da RVS. Pacientes não respondedores (NR) continuam tendo a evolução dos danos hepáticos, desta forma, foi encontrada correlação negativa entre os indivíduos com RVS e a progressão no grau de fibrose após o tratamento, como já esperado.

Sendo assim, neste trabalho, foi possível encontrar associações entre os polimorfismos gênicos em apolipoproteínas e receptores de lipoproteínas e pacientes com infecção crônica por HCV. O polimorfismo em APOA1 rs964184 foi eleito o mais promissor visto sua associação com características do vírus e com o metabolismo lipídico do hospedeiro. Desta forma, mais estudos serão necessários para verificar se essas variantes podem se tornar um possível marcador de prognóstico para ser utilizado no manejo clínico em pacientes com hepatite C crônica.

7. Perspectivas

Este trabalho apresenta as seguintes perspectivas:

- Aumentar o número de indivíduos controles saudáveis ($n =$ em torno de 100) e coletar características clínicas e demográficas para realizar as correlações com seus respectivos genótipos e alelos. Selecionar indivíduos controles com faixa etária semelhante à dos pacientes com hepatite C;
- Associar outras variantes envolvidas nas patologias que podem influenciar na gravidade dos pacientes com hepatite C crônica;
- Inserir pacientes que foram tratados com diferentes esquemas terapêuticos: terapia tripla e novos antivirais de ação direta (DAAs);
- Inserir pacientes com hepatite C aguda;
- Continuar as genotipagens da região em APOB rs676210 e tentar associar os genótipos e alelos encontrados com as características de pacientes com HCV.

8. Conclusão

As frequências genótípicas e alélicas foram bem próximas ao que consta no principal banco de dados de SNPs (SNPdb, NCBI) sobre a população latino-americana e a população mundial.

Não foram vistas associações entre APOB rs1042034 e as características clínicas dos pacientes com HCV. Entretanto, no SNP em APOA1 rs964184 foi vista associação entre o alelo G (considerado de risco) com maiores níveis de carga viral e triglicerídeos. LDLR rs5925 teve o alelo T associado a baixos níveis de triglicerídeos e de VLDL-colesterol. Além disso, foram encontradas correlações positivas e negativas entre diferentes características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes.

Os estudos de polimorfismos ajudam a compreender os fatores genéticos que influenciam em diversas doenças, bem como podem identificar o risco que o indivíduo tem de desenvolver determinada patologia. A partir disso, com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o SNP em LDLR rs5925 foi associado ao perfil lipídico dos pacientes, enquanto a variante genética mais promissora foi o SNP em APOA1 rs964184, que tem potencial para ser um bom biomarcador de prognóstico e, futuramente, auxiliar no manejo clínico dos pacientes com HCV.

9. Referências

- Abdulfattah SY, Al-Awadi SJ. ApoB gene polymorphism (rs676210) and its pharmacogenetics impact on atorvastatin response among Iraqi population with coronary artery disease. *J Genet Eng Biotechnol*. 2021 Jun 22;19(1):95. doi: 10.1186/s43141-021-00193-4.
- Acras RN, Pedroso MLA, Caum LC, Pisani JC, Amarante HMBS, Carmes ER. A taxa de resposta sustentada da hepatite C crônica ao tratamento com os diversos interferons-alfa e ribavirinas distribuídos pelo governo brasileiro é semelhante à da literatura mundial. *Arq Gastroenterol* [Internet]. 2004Jan;41(1):3–9. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0004-28032004000100002>.
- Aceves-Ramírez M, Valle Y, Casillas-Muñoz F, Martínez-Fernández DE, Parra-Reyna B, López-Moreno VA, Flores-Salinas HE, Valdés-Alvarado E, Muñoz-Valle JF, García-Garduño T, Padilla-Gutiérrez JR. Analysis of the APOB Gene and Apolipoprotein B Serum Levels in a Mexican Population with Acute Coronary Syndrome: Association with the Single Nucleotide Variants rs1469513, rs673548, rs676210, and rs1042034. *Genet Res (Camb)*. 2022 Mar 31;2022:4901090. doi: 10.1155/2022/4901090.
- Adinolfi LE, Rinaldi L, Nevola R. Chronic hepatitis C, atherosclerosis and cardiovascular disease: What impact of direct-acting antiviral treatments? *World J Gastroenterol*. 2018 Nov 7;24(41):4617-4621. doi: 10.3748/wjg.v24.i41.4617.
- Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 26;96(22):12766-71. doi: 10.1073/pnas.96.22.12766.
- Ali, Akhtar; et al. A Genetic Variant (S4338N) in Apolipoprotein B Gene in Hypercholesterolemic Families from Pakistan. *Zoological Society of Pakistan, Pakistan*, v. 48(5), p. 1423-1429, 1 ago. 2016.
- Alves, A. V., Azevedo, A. P. da C. de ., Perin, C., Ramos, G. Z., Brandão, A. B. de M., Mattos, A. A. de ., & Almeida, P. R. L. de .. (2003). Tratamento de pacientes com hepatite crônica pelo vírus C com interferon-alfa e ribavirina: a experiência da

Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul. Arquivos De Gastroenterologia, 40(4), 227–232. <https://doi.org/10.1590/S0004-28032003000400006>.

- Araújo KL de, Madeira KP, Daltoé RD, Rangel LBA, Silva IV. O Papel dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) Pvu II e Xba I e das Pequenas Repetições em Tandem (STRs) (TA)_n e (GT)_n do Receptor de Estrogênio Alfa (ESRI) na Suscetibilidade do Câncer da Mama(BRCA). Rev. Bras. Cancerol. [Internet]. 30º de junho de 2009 [citado 12º de janeiro de 2025];55(2):185-92. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/1650>
- Ávila MP de, Freitas AM, Isaac DLC, Bastos AL de M, Pena RV. Retinopatia em paciente portador de hepatite C tratado com interferon peguilado e ribavirina: relato de caso. Arq Bras Oftalmol [Internet]. 2006Mar;69(2):255–9. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0004-27492006000200022>.
- Bai W, Kou C, Zhang L, You Y, Yu W, Hua W, Li Y, Yu Y, Zhao T, Wu Y. Functional polymorphisms of the APOA1/C3/A4/A5-ZPR1-BUD13 gene cluster are associated with dyslipidemia in a sex-specific pattern. PeerJ. 2019 Jan 4;6:e6175. doi: 10.7717/peerj.6175.
- Barbosa, Kemere Marques Vieira et al. Hepatite C na década de 1980: resgate de casos das antigas hepatites "não A e não B" de um serviço de hepatologia na Amazônia, Brasil. Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua , v. 10, e201900096, 2019. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232019000100023&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 22 dez. 2024. Epub 09-Dez-2019. <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223201900096>.
- Bassendine MF, Sheridan DA, Bridge SH, Felmlee DJ, Neely RD. Lipids and HCV. Semin Immunopathol. 2013 Jan;35(1):87-100. doi: 10.1007/s00281-012-0356-2. Epub 2012 Oct 31.
- Bedossa, P.; Poynard, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. Hepatology, v. 24, n. 2, p. 289–293, 1996. <https://doi.org/10.1053/jhep.1996.v24.pm0008690394>.
- Benn M. Apolipoprotein B levels, APOB alleles, and risk of ischemic cardiovascular disease in the general population, a review. Atherosclerosis. 2009 Sep;206(1):17-

30. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.01.004. Epub 2009 Jan 15. PMID: 19200547.
- Beeson PB. The growth of knowledge about a disease: hepatitis. *Am J Med.* 1979 Sep;67(3):366-70. doi: 10.1016/0002-9343(79)90780-0. PMID: 224700.
 - Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, Hyland RH, Stamm LM, Brainard DM, Subramanian MG, McHutchison JG, Mo H, Svarovskaia E, Shafran SD. Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *J Infect Dis.* 2018 Oct 20;218(11):1722-1729. doi: 10.1093/infdis/jiy401. PMID: 29982508.
 - Bulut ME, Topalca US, Murat A, Teke L, Canalp HZ, Ocal M, Bayraktar B. HCV Genotype Distribution of Patients with Chronic Hepatitis C in Istanbul. *Sisli Etfal Hastan Tip Bul.* 2021 Mar 17;55(1):86-92. doi: 10.14744/SEMB.2020.66990. PMID: 33935541; PMCID: PMC8085459.
 - Blumberg BS. The curiosities of hepatitis B virus: prevention, sex ratio, and demography. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(1):14-20. doi: 10.1513/pats.200510-108JH. PMID: 16493147.
 - Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med.* 1967 May;66(5):924-31. doi: 10.7326/0003-4819-66-5-924. PMID: 4225883.
 - Brasil. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico Hepatites Virais 2024. Departamento de HIV/Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis, da Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente do Ministério da Saúde (Dathi/SVSA/MS). Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2024/boletim-epidemiologico-hepatites-virais-2024/view>. Acesso em: 23/12/2023
 - Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de HIV/Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis (DATHI/SVSA/MS). 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br> Acesso em: 23/12/2023

- Brasil. Ministério da Saúde. Saúde de A a Z. Hipertensão (pressão alta). 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hipertensao>. Acesso em: 07/02/2024
- Brasil. Ministério da Saúde. Manual Técnico para o diagnóstico das hepatites virais. 2018. Disponível em: https://qualitr.paginas.ufsc.br/files/2018/08/manual_tecnico_hepatites_08_2018_web.pdf. Acesso em: 23/12/2024
- Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite C e coinfeções, 2019.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Telelab - Diagnóstico de Hepatites Virais. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C Crônica e Coinfeções. Brasília: 2011.
- Bryant EK, Dressen AS, Bunker CH, Hokanson JE, Hamman RF, Kamboh MI, et al. (2013) A Multiethnic Replication Study of Plasma Lipoprotein Levels-Associated SNPs Identified in Recent GWAS. PLoS ONE 8(5): e63469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063469>
- Braun TR, Been LF, Singhal A, Worsham J, Ralhan S, Wander GS, Chambers JC, Kooner JS, Aston CE, Sanghera DK. A replication study of GWAS-derived lipid genes in Asian Indians: the chromosomal region 11q23.3 harbors loci contributing to triglycerides. PLoS One. 2012;7(5):e37056. doi: 10.1371/journal.pone.0037056. Epub 2012 May 18. PMID: 22623978; PMCID: PMC3356398.
- Bridge SH, Pagano S, Jones M, Foster GR, Neely D, Vuilleumier N, Bassendine MF. Autoantibody to apolipoprotein A-1 in hepatitis C virus infection: a role in atherosclerosis? Hepatol Int. 2018 Jan;12(1):17-25. doi: 10.1007/s12072-018-9842-5. Epub 2018 Feb 8. PMID: 29423541; PMCID: PMC5814532.
- Cao B, Liu M, Jiang T, Yu Q, Yuan T, Ding P, Zhou X, Huang Y, Zou Y, Huang F. HCV Genotype Distribution and Clinical Characteristics of HCV Mono-Infected and HCV/HIV Co-Infected Patients in Liangshan Prefecture, Sichuan Province, China.

- J Int Assoc Provid AIDS Care. 2023 Jan-Dec;22:23259582231217810. doi: 10.1177/23259582231217810. PMID: 38099656; PMCID: PMC10725143.
- Caruz A, Neukam K, Rivero-Juárez A, Herrero R, Real LM, Camacho A, Barreiro P, Labarga P, Rivero A, Pineda JA. Association of low-density lipoprotein receptor genotypes with hepatitis C viral load. *Genes Immun*. 2014 Jan;15(1):16-24. doi: 10.1038/gene.2013.56. Epub 2013 Oct 31. PMID: 24173146.
 - Castro APP, Hermsdorff HHM, Milagres LC, Albuquerque FM de, Filgueiras M de S, Rocha NP, et al.. Increased ApoB/ApoA1 ratio is associated with excess weight, body adiposity, and altered lipid profile in children. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 2019Mar;95(2):238–46. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jped.2017.12.008>
 - Cátia Ferrinho, Ana Catarina Alves, Mafalda Bourbon, Sequeira Duarte. Aplicabilidade da fórmula Martin-Hopkins e comparação com a fórmula Friedewald na estimativa do colesterol LDL na população do estudo e_COR. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. Volume 40, Issue 10, 2021. Pages 715-724, ISSN 0870-2551. <https://doi.org/10.1016/j.repc.2020.11.011>.
 - Centro de controle e prevenção de doenças, 2024. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hepatitis-c/about/index.html> acesso em: 29/12/2024
 - Chakravarti A, Dogra G, Verma V, Srivastava AP. Distribution pattern of HCV genotypes & its association with viral load. *Indian J Med Res*. 2011 Mar;133(3):326-31. PMID: 21441689; PMCID: PMC3103160.
 - Chappell, D. A., & Medh, J. D. (1998). Receptor-mediated mechanisms of lipoprotein remnant catabolism. *Progress in Lipid Research*, 37(6), 393–422. doi:10.1016/s0163-7827(98)00017-4
 - Chevaliez S, Pawlotsky JM. HCV Genome and Life Cycle. In: Tan SL, editor. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006. Chapter 1. PMID: 21250393.
 - Chiba-Falek, O., Linnertz, C., Guyton, J., Gardner, S. D., Roses, A. D., McCarthy, J. J., & Patel, K. (2012). Pleiotropy and allelic heterogeneity in the TOMM40-APOE genomic region related to clinical and metabolic features of hepatitis C infection. *Human Genetics*, 131(12), 1911–1920. doi:10.1007/s00439-012-1220-0

- Chigbu DI, Loonawat R, Sehgal M, Patel D, Jain P. Hepatitis C Virus Infection: Host-Virus Interaction and Mechanisms of Viral Persistence. *Cells*. 2019 Apr 25;8(4):376. doi: 10.3390/cells8040376. PMID: 31027278; PMCID: PMC6523734.
- Cochran BJ, Ong KL, Manandhar B, Rye KA. APOA1: a Protein with Multiple Therapeutic Functions. *Curr Atheroscler Rep*. 2021 Feb 16;23(3):11. doi: 10.1007/s11883-021-00906-7. PMID: 33591433.
- Conselho Federal de Biologia. 2020. Disponível em: <https://cfbio.gov.br/2020/10/05/biologos-ganham-nobel-de-medicina-de-2020-pela-descoberta-do-virus-da-hepatite-c/#:~:text=Dois%20bi%C3%B3logos%20e%20um%20m%C3%A9dico%20ganham%20Pr%C3%AAmio%20Nobel%20de%20Medicina%202020,-5%2F10%2F20&text=O%20m%C3%A9dico%20Harvey%20J.,do%20v%C3%ADrus%20da%20Hepatite%20C>. Acesso em: 13/01/2025
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989 Apr 21;244(4902):359-62. doi: 10.1126/science.2523562. PMID: 2523562.
- Crouchet E, Baumert TF, Schuster C. Hepatitis C virus-apolipoprotein interactions: molecular mechanisms and clinical impact. *Expert Rev Proteomics*. 2017 Jul;14(7):593-606. doi: 10.1080/14789450.2017.1344102. Epub 2017 Jun 30. PMID: 28625086; PMCID: PMC6138823.
- Cursino, c.; elias, c. Administração e gestão da assistência farmacêutica a evolução do tratamento da hepatite C no brasil. Disponível em: http://gafar.sites.uff.br/wp-content/uploads/sites/213/2020/06/A-evolu%C3%A7%C3%A3o-do-tratamento-da-HEPATITE-C-no-Brasil_Camille.pdf. Acesso em: 17 mar. 2025.
- Dao Thi VL, Granier C, Zeisel MB, Guérin M, Mancip J, Granio O, Penin F, Lavillette D, Bartenschlager R, Baumert TF, Cosset FL, Dreux M. Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *J Biol Chem*. 2012 Sep 7;287(37):31242-57. doi:

10.1074/jbc.M112.365924. Epub 2012 Jul 5. PMID: 22767607; PMCID: PMC3438956.

- Di Bisceglie, A. M. (1999). Hepatitis C—virology and future antiviral targets. *The American Journal of Medicine*, 107(6), 45–48. doi:10.1016/s0002-9343(99)00381-2
- Ding WY, Protty MB, Davies IG, Lip GYH. Relationship between lipoproteins, thrombosis, and atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2022 Feb 21;118(3):716-731. doi: 10.1093/cvr/cvab017. PMID: 33483737; PMCID: PMC8859639.
- Dustin, L. B., Bartolini, B., Capobianchi, M. R., & Pistello, M. (2016). Hepatitis C virus: life cycle in cells, infection and host response, and analysis of molecular markers influencing the outcome of infection and response to therapy. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(10), 826–832. doi:10.1016/j.cmi.2016.08.025
- Edmondson AC, Braund PS, Stylianou IM, Khera AV, Nelson CP, Wolfe ML, Derohannessian SL, Keating BJ, Qu L, He J, Tobin MD, Tomaszewski M, Baumert J, Klopp N, Döring A, Thorand B, Li M, Reilly MP, Koenig W, Samani NJ, Rader DJ. Dense genotyping of candidate gene loci identifies variants associated with high-density lipoprotein cholesterol. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011 Apr;4(2):145-55. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.110.957563. Epub 2011 Feb 8. PMID: 21303902; PMCID: PMC3319351.
- Elgretli W, Chen T, Kronfli N, Sebastiani G. Hepatitis C Virus-Lipid Interplay: Pathogenesis and Clinical Impact. *Biomedicines*. 2023 Jan 19;11(2):271. doi: 10.3390/biomedicines11020271. PMID: 36830808; PMCID: PMC9953247.
- Elwood C, Sauve LJ, Pick N. Preventing vertical transmission of HCV in Canada. *CMAJ*. 2019 Jun 17;191(24):E650-E651. doi: 10.1503/cmaj.181662. PMID: 31209131; PMCID: PMC6581523
- Esperança JC, Miranda WR, Netto JB, et al. Polymorphisms in IL-10 and INF- γ genes are associated with early atherosclerosis in coronary but not in carotid arteries: A study of 122 autopsy cases of young adults. *BBA Clinical*. 2015 Jun;3:214-220. DOI: 10.1016/j.bbacli.2015.02.005. PMID: 26674973; PMCID: PMC4661558.

- Espírito-Santo MP; Brandão-Mello, CE.; Marques, VA.; Lampe, E.; De Almeida, AJ. Analysis of hepatitis C virus (HCV) RNA load in platelets of HCV-monoinfected patients receiving antiviral therapy. *Annals of Hepatology*, v. 12, n. 3, p. 373–379, 1 maio 2013. DOI 10.1016/S1665-2681(19)30999-8.
- Faludi AA, Izar MC de O, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afiune A, et al.. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2017Aug;109(2):1–76. Available from: <https://doi.org/10.5935/abc.20170121>
- Fasano M, Ieva F, Ciarallo M, Caccianotti B, Santantonio TA. Acute Hepatitis C: Current Status and Future Perspectives. *Viruses*. 2024 Nov 6;16(11):1739. doi: 10.3390/v16111739. PMID: 39599853; PMCID: PMC11599108.
- Ferreira, Fernanda Letícia dos Santos et al. Análise espacial dos casos notificados de Hepatite C no Brasil, segundo macrorregiões de saúde, 2015 a 2020. 2023. Tese de Doutorado
- Fonseca, G. S. G. B. et al. Cirrose hepática e suas principais etiologias: Revisão da literatura. **E-Acadêmica**, v. 3, n. 2, p. e8332249, 10 ago. 2022.
- Fonseca JCF da. Histórico das hepatites virais. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2010May;43(3):322–30. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0037-8682201000030002>
- Fukuhara, T., Yamamoto, S., Ono, C. *et al.* Quasispecies of Hepatitis C Virus Participate in Cell-Specific Infectivity. *Sci Rep* 7, 45228 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep45228>
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
- Ganta NM, Gedda G, Rathnakar B, Satyanarayana M, Yamajala B, Ahsan MJ, Jadav SS, Balaraju T. A review on HCV inhibitors: Significance of non-structural polyproteins. *Eur J Med Chem*. 2019 Feb 15;164:576-601. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.12.045. Epub 2018 Dec 31. PMID: 30639895; PMCID: PMC7185800.

- Go GW, Mani A. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J Biol Med*. 2012 Mar;85(1):19-28. Epub 2012 Mar 29. PMID: 22461740; PMCID: PMC3313535.
- González-Grande R, Jiménez-Pérez M, González Arjona C, Mostazo Torres J. New approaches in the treatment of hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2016 Jan 28;22(4):1421-32. doi: 10.3748/wjg.v22.i4.1421. PMID: 26819511; PMCID: PMC4721977.
- Grassi G, Di Caprio G, Fimia GM, Ippolito G, Tripodi M, Alonzi T. Hepatitis C virus relies on lipoproteins for its life cycle. *World J Gastroenterol*. 2016 Feb 14;22(6):1953-65. doi: 10.3748/wjg.v22.i6.1953. PMID: 26877603; PMCID: PMC4726671.
- Guimarães, D.B. Associação de polimorfismos de nucleotídeo único (snps) dos genes psca, tp53 e nqo1 e sua relação com o desenvolvimento de carcinoma mamário em mulheres no estado da paraíba. 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/18318>. Acesso em: 12/01/2025
- Harada R, Kimura M, Sato Y, Taniguchi T, Tomonari T, Tanaka T, Tanaka H, Muguruma N, Shinomiya H, Honda H, Imoto I, Sogabe M, Okahisa T, Takayama T. APOB codon 4311 polymorphism is associated with hepatitis C virus infection through altered lipid metabolism. *BMC Gastroenterol*. 2018 Jan 30;18(1):24. doi: 10.1186/s12876-018-0747-5. PMID: 29382324; PMCID: PMC5791310.
- Hepatitis C online. 2024. Disponível em: <https://www.hepatitisc.uw.edu/> Acesso: 26/12/2024
- Hepatite C: Sintomas, transmissão e prevenção. Instituto de tecnologia em imunobiologicos (BIOMANGUINHOS- FIOCRUZ) 2022. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/hepatite-c>. Acesso em: 04/01/2025
- Houghton M. Hepatitis C Virus: 30 Years after Its Discovery. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019 Dec 2;9(12):a037069. doi: 10.1101/cshperspect.a037069. PMID: 31501269; PMCID: PMC6886456.
- Hutchinson SJ, Bird SM, Goldberg DJ. Influence of alcohol on the progression of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005 Nov;3(11):1150-9. doi: 10.1016/s1542-3565(05)00407-6. PMID: 16271348

- Iglecias, M.M.L. Aspectos soropidemiológicos e moleculares da infecção pelo vírus da hepatite B em privados de liberdade portadores de tuberculose em Campo Grande, MS. 2015. Dissertação de mestrado em Farmácia. Universidade Federal do Mato Grosso.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. 2024. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy> Acesso: 23/12/2024
- Johansen CT, Kathiresan S, Hegele RA. Genetic determinants of plasma triglycerides. J Lipid Res. 2011 Feb;52(2):189-206. doi: 10.1194/jlr.R009720. Epub 2010 Nov 1. PMID: 21041806; PMCID: PMC3023540.
- Juarez Casso FM, Farzam K. Biochemistry, Very Low Density Lipoprotein. [Updated 2022 Dec 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: https://www.ncbi-nlm-nih-gov.translate.goog/books/NBK587400/? x tr sl=en& x tr tl=pt& x tr hl=pt& x t r_pto=tc
- Kampfrath T, VLDL Cholesterol Testing, 2022. Disponível em: <https://www.testing.com/tests/vldl-cholesterol/> Acesso em: 12/02/2025
- Karki, R. et al. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. BMC medical genomics, v. 8, n. 1, p. 37, 2015.
- Kohara M. Hepatitis C virus replication and pathogenesis. J Dermatol Sci. 2000 Apr;22(3):161-8. doi: 10.1016/s0923-1811(99)00082-1. PMID: 10698153.
- Lavie M, Dubuisson J. Interplay between hepatitis C virus and lipid metabolism during virus entry and assembly. Biochimie. 2017 Oct;141:62-69. doi: 10.1016/j.biochi.2017.06.009. Epub 2017 Jun 16. PMID: 28630011.
- Leslie J, Geh D, Elsharkawy AM, Mann DA, Vacca M. Metabolic dysfunction and cancer in HCV: Shared pathways and mutual interactions. J Hepatol. 2022 Jul;77(1):219-236. doi: 10.1016/j.jhep.2022.01.029. Epub 2022 Feb 12. PMID: 35157957.

- Li HC, Yang CH, Lo SY. Cellular factors involved in the hepatitis C virus life cycle. *World J Gastroenterol*. 2021 Jul 28;27(28):4555-4581. doi: 10.3748/wjg.v27.i28.4555. PMID: 34366623; PMCID: PMC8326260.
- Li, H., Liu, Z., Han, Q., Li, Y., & Chen, J. (2006). Association of genetic polymorphism of low-density lipoprotein receptor with chronic viral hepatitis C infection in Han Chinese. *Journal of Medical Virology*, 78(10), 1289–1295. doi:10.1002/jmv.20693
- Lindenbach BD, Rice CM. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat Rev Microbiol*. 2013 Oct;11(10):688-700. doi: 10.1038/nrmicro3098. Epub 2013 Sep 10. PMID: 24018384; PMCID: PMC3897199.
- Li Q, Huang C, Xu W, Hu Q, Chen L. Accuracy of FibroScan in analysis of liver fibrosis in patients with concomitant chronic Hepatitis B and nonalcoholic fatty liver disease. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Jun 5;99(23):e20616. doi: 10.1097/MD.00000000000020616. PMID: 32502037; PMCID: PMC7306346.
- Luna-Cuadros MA, Chen HW, Hanif H, Ali MJ, Khan MM, Lau DTY. Risk of hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus cure. *World J Gastroenterol* 2022; 28(1): 96-107 [PMID: PMC8793019 DOI: 10.3748/wjg.v28.i1.96]
- Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*. 1984 Dec 1;25(12):1277-94. PMID: 6099394.
- Mancone, C., Steindler, C., Santangelo, L., Simonte, G., Vlassi, C., Longo, M. A., ... Alonzi, T. (2010). Hepatitis C virus production requires apolipoprotein A-I and affects its association with nascent low-density lipoproteins. *Gut*, 60(3), 378–386. doi:10.1136/gut.2010.211292
- Manns, M. P., Buti, M., Gane, E., Pawlotsky, J.-M., Razavi, H., Terrault, N., & Younossi, Z. (2017). Hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17006. doi:10.1038/nrdp.2017.6
- Martell M, Esteban JI, Quer J, Genescà J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gómez J. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely

- related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol.* 1992 May;66(5):3225-9. doi: 10.1128/JVI.66.5.3225-3229.1992. PMID: 1313927; PMCID: PMC241092.
- Martin SS, Blaha MJ, Elshazly MB, et al. Comparison of a Novel Method vs the Friedewald Equation for Estimating Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels From the Standard Lipid Profile. *JAMA.* 2013;310(19):2061–2068. doi:10.1001/jama.2013.280532
 - Martínez-Morillo E, García-García M, Concha MAL, Varas LR. Evaluation of a new equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol through the comparison with various recommended methods. *Biochem Med (Zagreb).* 2021;31:01070
 - Ma Z, Zhong J, Tu W, Li S, Chen J. The functions of apolipoproteins and lipoproteins in health and disease. *Mol Biomed.* 2024 Oct 28;5(1):53. doi: 10.1186/s43556-024-00218-7. PMID: 39465476; PMCID: PMC11513782.
 - Mbisa JL, Lapp Z, Bibby DF, Phillips LT, Manso CF, Packer S, Simmons R, Harris K, Mohan J, Chinnappan L, Leitner T, Bradshaw D. Identification of 2 Novel Subtypes of Hepatitis C Virus Genotype 8 and a Potential New Genotype Successfully Treated With Direct Acting Antivirals. *J Infect Dis.* 2024 Dec 16;230(6):e1254-e1262. doi: 10.1093/infdis/jiae253. PMID: 38717937; PMCID: PMC11646602.
 - Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2015 Jan;61(1):77-87. doi: 10.1002/hep.27259. Epub 2014 Jul 28. PMID: 25069599; PMCID: PMC4303918.
 - Miao Z, Xie Z, Miao J, Ran J, Feng Y, Xia X. Regulated Entry of Hepatitis C Virus into Hepatocytes. *Viruses.* 2017 May 9;9(5):100. doi: 10.3390/v9050100. PMID: 28486435; PMCID: PMC5454413.
 - Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215. doi: 10.1093/nar/16.3.1215. PMID: 3344216; PMCID: PMC334765.
 - Minelli C, Thompson JR, Abrams KR, Thakkinstian A, Attia J. The choice of a genetic model in the meta-analysis of molecular association studies. *Int J*

- Epidemiol. 2005 Dec;34(6):1319-28. doi: 10.1093/ije/dyi169. Epub 2005 Aug 22. PMID: 16115824.
- Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. Nat Rev Microbiol. 2007 Jun;5(6):453-63. doi: 10.1038/nrmicro1645. Epub 2007 May 8. PMID: 17487147.
 - Morozov VA, Lagaye S. Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. World J Hepatol. 2018 Feb 27;10(2):186-212. doi: 10.4254/wjh.v10.i2.186. PMID: 29527256; PMCID: PMC5838439.
 - Mukherjee R, Burns A, Rodden D, et al. Diagnosis and Management of Hepatitis C Virus Infection. Journal of Laboratory Automation. 2015;20(5):519-538. doi:10.1177/2211068214563794
 - National Library of Medicine. 2024. Disponível em: https://www-ncbi-nlm-nih-gov.translate.goog/gene/3949?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=pt&_x_tr_hl=pt&_x_tr_pto=tc Acesso em: 12/01/2025
 - National Center for Biotechnology Information (NCBI) Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Acesso em: 09/02/2025
 - National Center for Biotechnology Information (NCBI) Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. SNPdb. 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. Acesso em: 05/01/2025
 - Negro F. Facts and fictions of HCV and comorbidities: steatosis, diabetes mellitus, and cardiovascular diseases. J Hepatol. 2014 Nov;61(1 Suppl):S69-78. doi: 10.1016/j.jhep.2014.08.003. Epub 2014 Nov 3. PMID: 25443347.
 - Neamatzadeh H, Dastgheib SA, Mazaheri M, Masoudi A, Shiri A, Omid A, Rahmani A, Golshan-Tafti A, Aghasipour M, Yeganegi M, Bahrami M, Aghili K, Khajehnoori S, Mosavi Jarrahi A. Hardy-Weinberg Equilibrium in Meta-Analysis Studies and Large-Scale Genomic Sequencing Era. Asian Pac J Cancer Prev. 2024 Jul 1;25(7):2229-2235. doi: 10.31557/APJCP.2024.25.7.2229.

- Nutrigenetics Specialists, 2017. Disponível em: <https://www.nutrigeneticsspecialists.com/single-post/2017/03/27/what-is-a-snp>. Acesso em: 12/01/2025
- Organização Mundial da Saúde. Hepatitis C. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> Acesso em: 24/12/2024.
- Packard CJ, Boren J, Taskinen MR. Causes and Consequences of Hypertriglyceridemia. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 May 14;11:252. doi: 10.3389/fendo.2020.00252. PMID: 32477261; PMCID: PMC7239992.
- Paraná & Almeida 2024. Disponível em: <https://sbhepatologia.org.br/pdf/historia.pdf> Acesso em: 16/12/2024.
- Preciado MV, Valva P, Escobar-Gutierrez A, Rahal P, Ruiz-Tovar K, Yamasaki L, Vazquez-Chacon C, Martinez-Guarneros A, Carpio-Pedroza JC, Fonseca-Coronado S, Cruz-Rivera M. Hepatitis C virus molecular evolution: transmission, disease progression and antiviral therapy. *World J Gastroenterol*. 2014 Nov 21;20(43):15992-6013. doi: 10.3748/wjg.v20.i43.15992. PMID: 25473152; PMCID: PMC4239486.
- Pol, S.; Lagaye, S. The remarkable history of the hepatitis C virus. *Genes and Immunity*, v.20, n. 5, p. 436–446, 2019. DOI 10.1038/s41435-019-0066z.
- Popescu CI, Riva L, Vlaicu O, Farhat R, Rouillé Y, Dubuisson J. Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism. *Biology (Basel)*. 2014 Dec 15;3(4):892-921. doi: 10.3390/biology3040892. PMID: 25517881; PMCID: PMC4280516.
- Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 1997 Mar 22;349(9055):825-32. doi: 10.1016/s0140-6736(96)07642-8. PMID: 9121257.
- Qiu L, Yin RX, Khounphinit E, Zhang FH, Yang DZ, Pan SL. Association of the APOA1 rs964184 SNP and serum lipid traits in the Chinese Maonan and Han populations. *Lipids Health Dis*. 2018 May 10;17(1):105. doi: 10.1186/s12944-018-0759-8. PMID: 29747660; PMCID: PMC5944063.

- Ramos JA, Ramos AL, Hoffmann L, Perez Rde M, Coelho HS, Urményi TP, Silva R, Rondinelli E, Villela-Nogueira CA. A single nucleotide polymorphism, rs129679860, in the IL28B locus is associated with the viral kinetics and a sustained virological response in a chronic, monoinfected hepatitis C virus genotype-1 Brazilian population treated with pegylated interferon-ribavirin. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Nov;107(7):888-92. doi: 10.1590/s0074-02762012000700008. PMID: 23147144.
- Real, L. M., Fernández-Fuertes, M., Sáez, M. E., Rivero-Juárez, A., Frías, M., Téllez, F., ... Pineda, J. A. (2019). A genome-wide association study in low susceptibility to hepatitis C virus infection (GEHEP012 Study). *Liver International*. doi:10.1111/liv.14177
- REZENDE, Claudio Campos da Cunha et al. Saúde a que preço? Contribuições da experiência internacional para universalização do acesso e controle da hepatite C no Brasil. 2021. Tese de Doutorado.
- Rice CM. New insights into HCV replication: potential antiviral targets. *Top Antivir Med*. 2011 Aug-Sep;19(3):117-20. PMID: 21946389; PMCID: PMC6148863.
- Rojas C, Ramírez H, Salazar LA, et al. Characterization of LDLR rs5925 and PCSK9 rs505151 genetic variants frequencies in healthy subjects from northern Chile: Influence on plasma lipid levels. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2019 Nov;33(9):e23001. DOI: 10.1002/jcla.23001. PMID: 31441123; PMCID: PMC6868413.
- Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100(20):11646-51. doi: 10.1073/pnas.1834545100. Epub 2003 Sep 22. PMID: 14504405; PMCID: PMC208812.
- San Matteo County Community College District, 2024. Disponível em: <https://smccd.edu/> Acesso em: 02/02/2025.
- Santana, C. R. análise sorológica de hepatite A em suínos domésticos de dois municípios do estado do Pará. 2015. Trabalho de conclusão de curso

(Bacharelado em medicina veterinária) Universidade Federal Rural da Amazônia, campus Belém.

- Satoor S, Raufman JP. Treatment of hepatitis C. Clin Cornerstone. 2001;3(6):37-46. doi: 10.1016/s1098-3597(01)90077-8. PMID: 11501193.
- Secretaria de Estado e Saúde do Mato Grosso, 2015. Disponível em: https://www.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2015/11/TER_HEPATITE__C_VIRAL_CR%C3%94NICA.pdf
Acesso em: 04/01/2025
- Setu, T. J.; Basak, T. An Introduction to Basic Statistical Models in Genetics. Open Journal of Statistics, v. 11, n. 06, p. 1017–1025, 2021. <https://doi.org/10.4236/ojs.2021.116060>.
- Shastri, B. S. (2007). *SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution*. Journal of Human Genetics, 52(11), 871–880. doi:10.1007/s10038-007-0200-z
- Scheen AJ, Philips JC, Krzesinski JM. Hypertension et diabète: à propos d'une association commune mais complexe [Hypertension and diabetes: about a common but complex association]. Rev Med Liege. 2012 Mar;67(3):133-8. French. PMID: 22611829.
- Schmid, R. (2001), History of viral hepatitis: A tale of dogmas and misinterpretations¹. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 16: 718-722. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2001.02509.x>
- Slatkin M. Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. Nat Rev Genet. 2008 Jun;9(6):477-85. doi: 10.1038/nrg2361. PMID: 18427557; PMCID: PMC5124487.
- Soriano, V., Mocroft, A., Rockstroh, J., Ledergerber, B., Knysz, B., ... Chaplinskas, S. (2008). Spontaneous Viral Clearance, Viral Load, and Genotype Distribution of Hepatitis C Virus (HCV) in HIV-Infected Patients with Anti-HCV Antibodies in Europe. The Journal of Infectious Diseases, 198(9), 1337–1344. doi:10.1086/592171

- Souza AM de, Resende SS, Sousa TN de, Brito CFA de. A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population. *Genet Mol Biol* [Internet]. 2019Jul;42(3):495–508. Available from: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2018-0076>
- Strauss E. Hepatite C. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2001Jan;34(1):69–82. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0037-8682200100010001>
- Syed GH, Tang H, Khan M, Hassanein T, Liu J, Siddiqui A. Hepatitis C virus stimulates low-density lipoprotein receptor expression to facilitate viral propagation. *J Virol*. 2014 Mar;88(5):2519-29. doi: 10.1128/JVI.02727-13. Epub 2013 Dec 18. PMID: 24352472; PMCID: PMC3958050.
- Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 2009 Oct;41(10):1105-9. doi: 10.1038/ng.449. Epub 2009 Sep 13.
- Targett-Adams P, Boulant S, Douglas MW, McLauchlan J. Lipid metabolism and HCV infection. *Viruses*. 2010 May;2(5):1195-1217. doi: 10.3390/v2051195. Epub 2010 May 11. PMID: 21994676; PMCID: PMC3187597.
- Torrents de la Peña A, Sliepen K, Eshun-Wilson L, Newby ML, Allen JD, Zon I, Koekkoek S, Chumbe A, Crispin M, Schinkel J, Lander GC, Sanders RW, Ward AB. Structure of the hepatitis C virus E1E2 glycoprotein complex. *Science*. 2022 Oct 21;378(6617):263-269. doi: 10.1126/science.abn9884. Epub 2022 Oct 20. PMID: 36264808; PMCID: PMC10512783.
- Tratamento da hepatite C: do interferon aos antivirais de ação direta. ARTMED 2024. Disponível em: <https://artmed.com.br/artigos/tratamento-da-hepatite-c-do-interferon-aos-antivirais-de-acao-direta>. Acesso em: 05/01/2025
- The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2020. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2020/advanced-information/>. Acesso em: 11/02/2025

- Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, Rice CM. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol.* 2006 Feb;80(4):1734-41. doi: 10.1128/JVI.80.4.1734-1741.2006. PMID: 16439530; PMCID: PMC1367161.
- Tsukiyama-Kohara K, Kohara M. Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes. *Int J Mol Sci.* 2017 Dec 22;19(1):23. doi: 10.3390/ijms19010023. PMID: 29271914; PMCID: PMC5795974.
- Virology research services, 2022. Disponível em: [https://virologyresearchservices.com/2022/05/22/enveloped-vs-non-enveloped-viruses/#:~:text=Enveloped%20viruses%20are%20typically%20less%20virulent&text=This%20is%20because%20they%20don,SARS%2DCoV%2D2\).](https://virologyresearchservices.com/2022/05/22/enveloped-vs-non-enveloped-viruses/#:~:text=Enveloped%20viruses%20are%20typically%20less%20virulent&text=This%20is%20because%20they%20don,SARS%2DCoV%2D2).) Acesso em: 25/12/2024
- Wpcalc, 2024. Disponível em: <https://wpcalc.com/em/equilibrium-hardy-weinberg/> Acesso em: 02/02/2025.
- Woyesa SB, Amente KD. Hepatitis C Virus Dynamic Transmission Models Among People Who Inject Drugs. *Infect Drug Resist.* 2023 Feb 20;16:1061-1068. doi: 10.2147/IDR.S403133. PMID: 36845020; PMCID: PMC9951810.
- Wrensch F. et al. Hepatitis C virus (HCV)-apolipoprotein interactions and immune evasion and their impact on HCV vaccine design. *Frontiers in Immunology*, v. 9, jun. 2018.
- Yechezkel I, Law M, Tzarum N. From Structural Studies to HCV Vaccine Design. *Viruses.* 2021 May 4;13(5):833.
- Zamora-Obando, H. R., Godoy, A. T., Amaral, A. G., Mesquita, A. de S., Simões, B. E. S., Reis, H. O., Rocha, I., Dallaqua, M., Baptista, M., Fernandes, M. C. V., Lima, M. F., & Simionato, A. V. C.. (2022). BIOMARCADORES MOLECULARES DE DOENÇAS HUMANAS: CONCEITOS FUNDAMENTAIS, MODELOS DE ESTUDO E APLICAÇÕES CLÍNICAS. *Química Nova*, 45(9), 1098–1113. <https://doi.org/10.21577/0100->
- Zapatero-Belinchón FJ, Ötjengerdes R, Sheldon J, Schulte B, Carriquí-Madroñal B, Brogden G, Arroyo-Fernández LM, Vondran FWR, Maasoumy B, von Hahn T,

Gerold G. Interdependent Impact of Lipoprotein Receptors and Lipid-Lowering Drugs on HCV Infectivity. *Cells*. 2021 Jun 29;10(7):1626. doi: 10.3390/cells10071626. PMID: 34209751; PMCID: PMC8303410.

- Zhang FH, Yin RX, Yao LM, Yan RQ, Lu L, Su Y. Correlation Between the *APOB* rs1042034 SNP and Blood Lipid Characteristics of 2 Ethnic Groups in China. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2019 Jan-Dec;25:1076029619892088. doi: 10.1177/1076029619892088. PMID: 31833377; PMCID: PMC7019501.
- Zhao, F.; Song, M.; Wang, Y.; Wang, W. Genetic model. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 20, n. 4, p. 765, 2016. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12751>.

ANEXOS

1- Aprovação 1 no Comitê de Ética em Pesquisa (HUCFF-UFRJ)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Comissão de Investigação Científica/11E49/DG

CI-229/05 – CIC/DG

Rio de Janeiro, 14 de dezembro de 2005

Do : Coordenador da CIC (Prof.Armando Nogueira)

Ao:(a) Profa. Cristiane Alves Villela Nogueira

Serviço: **Hepatologia**

Prezado Pesquisador (a),

Tendo o seu projeto de pesquisa com o título " Hepatite Crônica C- Avaliação da resposta viral ao tratamento pelo método do PCR real time. Importância da diversidade genética do HCV e de polimorfismo gênicos no diagnóstico, prognósticos, tratamento e no custo para o sistema de saúde." (Aprovado) no CEP e Cadastrado na CIC, com as seguintes numerações, CEP:166/05 e CIC:148/05.

Com isso, a CIC, oferece os seguintes serviços ao pesquisador, posters e consultoria estatística, para projetos desenvolvidos totalmente ou parcialmente no **HUCFF**.

Agradecemos o envio do projeto a esta Comissão e contamos com sua visita para que possamos trabalhar em equipe, para o enriquecimento da pesquisa científica no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho.

Obs: Gostaríamos de ressaltar que a partir de abril/03 a CIC, vem realizando o serviço de **PLOTAGEM**, pelo qual é cobrado a quantia de R\$ 50,00 (cinquenta reais) para o papel fosco, e R\$ 60,00 (sessenta reais) para o papel brilhoso com o fundo branco, e R\$ 70,00(setenta reais) brilhoso com o fundo colorido, para maiores informações telefonar para o ramal 2594.

Atenciosamente,

Prof. Armando Nogueira
Coordenador da CIC
CIC/11E49/DG
Tel: 2594-2594
Fax: 2594-2594

2- Aprovação 2 no Comitê de Ética em Pesquisa (HUCFF-UFRJ)

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
/HUCFF/ UFRJ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Diversidade genética viral e de pacientes com hepatite C, tratados ou não tratados com antivirais de ação direta (DAAs): aspectos clínicos, genéticos e virológicos no diagnóstico, prognóstico e tratamento.

Pesquisador: Rosane Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51599214.4.0000.5257

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.396.987

Apresentação do Projeto:

Protocolo 325-15. Respostas recebidas em 16.1.2016.

3- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) Hospital Universitário Clementino
Fraga Filho (HUCFF) SERVIÇO DE HEPATOLOGIA**
Rua Rodolpho Paulo Rocco, 255 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão - Rio de Janeiro –
RJ
CEP:21941-913
Sala 9E 36 Tel.: (21) 3938-2731

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Antes que você decida participar deste estudo é importante que você leia com atenção as informações abaixo. Esta folha e as seguintes contêm informações sobre coletas de sangue que você poderá vir a fazer. O responsável pelo estudo discutirá com você e responderá a qualquer dúvida que possa ter. Sua participação no estudo é voluntária e você está livre para retirar-se do mesmo a qualquer momento.

Título do Estudo: Diversidade genética viral e de pacientes com hepatite C, tratados e não tratados com antivirais de ação direta (DAAs): aspectos clínicos, genéticos e virológicos no diagnóstico, prognóstico e tratamento.

EXPLICAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo que tem por objetivo avaliar a característica do vírus da hepatite C e de algumas características dos participantes da pesquisa que podem influenciar no diagnóstico, prognóstico e resposta para a doença que você tem diagnosticada: a hepatite C. Antes, durante e após o seu tratamento você será acompanhado pelo serviço de Hepatologia do HUCFF-UFRJ através de exames clínicos e laboratoriais em conformidade com a portaria do Ministério da Saúde para o tratamento da hepatite C pelo SUS. Através deste termo você está autorizando a realização de seus marcadores genéticos como por exemplo alterações no material genético (DNA) de alguns genes (como polimorfismos no gene de substâncias liberadas pelo sistema imunológico chamadas citocinas, como a da interleucina-28), além da determinação de características virais, como de variabilidade genética. Exames laboratoriais complementares, como marcadores da função da tireoide, poderão ser necessários durante o estudo.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é verificar quais são as características genéticas e clínicas, tanto do paciente quanto do vírus pelo qual está infectado, importantes na avaliação do comportamento da hepatite C, nos pontos de vista de previsão (prognóstico), tipo de tratamento mais adequado, assim como resposta ao tratamento. Este estudo poderá ajudar a definir um melhor tratamento para os pacientes que apresentarem determinadas características. Além disso, o vírus será estudado e permitirá identificar vírus que sejam mais resistentes ao tratamento.

PROCEDIMENTOS E USO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Conforme rotina do ambulatório, serão realizadas coletas de seu sangue para o acompanhamento laboratorial da evolução do tratamento. Uma amostra armazenada em um tubo contendo 3 mililitros (mL) do seu sangue será utilizada na determinação de variações no DNA de genes, e outro tubo contendo 10 mililitros (10 mL) do seu sangue no estudo da 94 diversidade viral e eventuais exames laboratoriais complementares. É necessária a coleta em dois tubos diferentes para retirada de sangue total para análise do DNA e apenas do soro para estudar o vírus. O material coletado será armazenado no Laboratório de Metabolismo Macromolecular Firmino Torres de Castro do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, localizado no prédio do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da UFRJ. A utilização do seu material será para o projeto em questão, porém podendo ser utilizado em pesquisas futuras. Mas para isto, novo projeto será submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Da mesma forma, novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) será elaborado e nova assinatura sua será solicitada.

RISCOS

Durante os procedimentos de coleta de sangue, você poderá apresentar um hematoma (mancha roxa) no local da punção venosa para retirada do sangue a ser examinado. Parte das coletas de sangue já seriam realizadas independentemente do estudo, já que são necessárias para monitoramento clínico e terapêutico dos participantes da pesquisa.

EU TEREI DE FAZER VISITAS EXTRAS AO MÉDICO?

Durante o seu tratamento você terá que realizar uma visita mensal no primeiro trimestre (com 4, 8 e 12 semanas de tratamento), uma visita após 24 semanas de início do tratamento,

além de uma visita 12 semanas após o fim do tratamento para definição de resposta. Antes, durante e após o seu tratamento você será solicitado a realizar exames de sangue. As coletas de sangue se realizarão nas seguintes datas: (1) antes do início do tratamento, (2) 4 semanas, 8 semanas, 12 semanas e 24 semanas após o início e (3) um ponto após o fim do tratamento. Conforme o antiviral utilizado no tratamento, poderá haver alguma alteração no cronograma de coleta.

POSSÍVEIS BENEFÍCIOS

Você poderá não se beneficiar por participar deste estudo, porém você estará ajudando os pesquisadores a compreender melhor esta infecção, o que poderá resultar, no futuro, no aperfeiçoamento do tratamento das pessoas com esta doença. Este estudo será submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa desta Instituição. Sua realização está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/6 e 251/97) que assegura proteção aos voluntários envolvidos em pesquisas biomédicas.

ORIENTAÇÕES GERAIS

- Você não é obrigado a participar deste estudo. Você pode recusar-se a participar do mesmo podendo deixá-lo a qualquer momento, sem ter que fornecer as razões para tanto. Sua decisão não afetará seu direito à assistência médica.
- O médico pesquisador estará a sua disposição para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir a respeito do estudo. Você poderá comunicar-se com: Dra. Cristiane A. Villela Nogueira pelo telefone 3938-2731 para dúvidas sobre o seu acompanhamento clínico, ou Dra. Rosane Silva para dúvidas sobre marcadores genéticos e laboratoriais, pelo telefone 2564-7364, ou Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pelo telefone 3938-2480, de segunda a sexta-feira das 08:00 às 16:00 hs, ou email cep@hucff.ufrj.br.
- As informações pessoais obtidas a seu respeito durante o estudo permanecerão confidenciais.
- Se você decidir participar, será necessário um consentimento por escrito.

CONSENTIMENTO FINAL DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Título do Estudo: **Diversidade genética viral e de pacientes com hepatite C, tratados e não tratados com antivirais de ação direta (DAAs): aspectos clínicos, genéticos e virológicos no diagnóstico, prognóstico e tratamento**

1. Li o documento de consentimento livre e esclarecido para este estudo. Recebi as informações necessárias sobre a natureza, proposta do procedimento e o que será esperado de mim. Minhas dúvidas foram devidamente esclarecidas.
2. Concordo em participar deste estudo de forma totalmente voluntária.
3. Você e seu acompanhante, se for o caso, serão ressarcidos em caso de despesa exclusiva com esta pesquisa, como transporte e alimentação, se necessário.
4. Informe ao médico sobre todas as doenças e medicamentos anteriores ou atuais e sobre qualquer consulta com outro médico nos últimos três meses.
5. A minha participação neste estudo é voluntária, podendo recusar-me a participar ou retirar-me do estudo a qualquer momento, sem penalidade ou perda dos benefícios aos quais tenha direito.
6. Concordo que os resultados do estudo podem ser comunicados à comunidade científica e publicados em revistas científicas, mantendo em sigilo o meu nome e o meu endereço.
7. Autorizo comitês de ética, autoridades regulatórias locais ou estrangeiras, a examinarem, se assim o desejarem, estes registros médicos para confirmação das informações coletadas.

Nome do participante da pesquisa ou representante legal

Assinatura _____ Data _____

Pesquisador responsável ou pessoa designada pelo pesquisador responsável

Assinatura _____ Data _____