

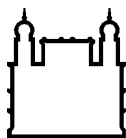
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Parasitária

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS
RELACIONADOS À VITAMINA D E RESISTÊNCIA INSULÍNICA EM
PACIENTES MONOINFECTADOS COM HCV

LETÍCIA DE PAULA SCALIONI

Rio de Janeiro
Agosto de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LETÍCIA DE PAULA SCALIONI

Avaliação dos níveis séricos e polimorfismos genéticos relacionados à vitamina D e resistência insulínica em pacientes mono infectados com HCV

Tese ou dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências em Biologia Parasitária.

Orientador (es): Prof. Dra. Livia Melo Villar

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2017

DE PAULA SCALIONI, LETÍCIA .

Avaliação dos níveis séricos e polimorfismos genéticos relacionados à vitamina D e resistência insulínica em pacientes mono infectados com HCV / LETÍCIA DE PAULA SCALIONI. - Rio de Janeiro, 2017.

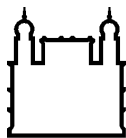
163 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientadora: Livia Melo Villar.

Bibliografia: f. 1-163

1. vitamina D. 2. polimorfismo. 3. resistência insulínica. 4. core. 5. HCV.
I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: LETÍCIA DE PAULA SCALIONI

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS
RELACIONADOS À VITAMINA D E RESISTÊNCIA INSULÍNICA EM
PACIENTES MONOINFECTADOS COM HCV**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Livia Melo Villar

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Luciane Almeida Amado Leon - Presidente (IOC-Fiocruz/RJ)

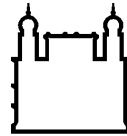
Prof. Dr. Milton Osório Moraes (IOC-Fiocruz/RJ)

Prof. Dra. Flávia Fioruci Bezerra (UERJ-RJ)

Prof. Dra. Carmem Baur Vieira (UFF-RJ)

Prof. Dr. Pedro Hernan Cabello Acero (IOC-Fiocruz/RJ)

Rio de Janeiro, 29 de agosto de 2017.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Dedico este trabalho aos maiores incentivadores de minha jornada em busca de conhecimento, meu pai Lenilson Scalioni (*in memoriam*) e a Dra. Livia Melo Villar.

AGRADECIMENTOS

O doutorado é o fim de um ciclo que iniciou em minha graduação em Vassouras, um caminho que começou cheio de sonhos e expectativas e termina com a realidade de que, por maior que seja o esforço realizado, sempre saberemos muito pouco daquilo que buscamos conhecer. A única certeza que temos é que sempre haverá muito a se aprender. E esta é a beleza do conhecimento ao qual sou tão fascinada.

Assim, agradeço em primeiro lugar a Deus por sua infinita bondade e amor, o que me fortaleceu e permitiu que mesmo diante de todos os desafios desta jornada eu conseguisse finda-la para sua honra e glória.

Agradeço a minha família, em especial meus pais Maria Teresa Paula Scalioni e Lenilson Scalioni (*in memoriam*), minha irmã e cunhado Marina de Paula Scalioni e Carlos Eduardo Baptista e a minha prima Alessandra Scalioni Brito. A vocês todo meu amor e gratidão pelo apoio incondicional e por acreditarem sempre em mim mesmo em períodos de total adversidade. Agradeço também por sempre terem apoiado minhas escolhas, ainda que estas trouxessem a distância, o pouco convívio e muitas preocupações.

Agradeço minha orientadora Dra. Livia Melo Villar. Livia, a palavra gratidão é insuficiente para descrever e agradecer tudo o que você fez por mim desde a iniciação científica até o término deste doutorado. Muito obrigada por caminhar comigo e me proporcionar à conquista deste sonho. Que a tese não seja o fim, mas o início de uma parceria de bons frutos.

Agradeço a todos do Laboratório de Hepatites Virais em especial a Dra Elisabeth Lampe pelo apoio e acolhimento em seu laboratório todos estes anos e a Elisangela Ferreira da Silva, Juliana Custódio Miguel, Vanessa Alves Marques, Lucy Dalva, Islene Azevedo, Rosane Vieira, Nailma Rosário e Gisele Prado pelo apoio técnico em suas respectivas áreas.

As alunas e ex-alunas da Dra Livia, Janai Lima, Ketlyn Araújo, Raíssa Martins, Ana Carolina Mendonça, Helena Medina, Geane Flores, Moyra Portilho, Cristiane Bezerra e Jakeline Barbosa, obrigada por compartilharem conhecimento, trabalho e o nervosismo comum entre as alunas que defenderam este ano. Acredito que com minha defesa, a última de 2017, encerramos os “doutorandos anônimos”.

Aos nossos colaboradores, Dra Lia Laura Lewis-Ximenez, Dra Cristiane Villela, Dra Poli Mara Spritzer, Dra Priscila Pollo Flores, Dr Eduardo Brandão e em especial nosso saudoso amigo e colaborador Prof Dr Adilson José de Almeida, agradeço as contribuições intelectuais, amostras e informações cedidas.

Agradeço ao Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz, a Pós-Graduação em Biologia Parasitária, a CAPES e Faperj por financiarem nossos trabalhos e a minha bolsa de estudo.

Agradeço aos membros da banca por aceitarem cordialmente participar da minha defesa de tese.

Agradeço aos voluntários que cederam seu material biológico sem o qual este trabalho não seria realizado.

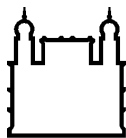
Agradeço a D Gilda Carvalheira Ribeiro Ramos por me receber em sua casa e por toda sua generosidade durante estes anos.

Agradeço a Dra Mercedes Cupolillo por me ensinar a viver de forma mais leve e enxergar os desafios e dificuldades apenas como processos do nosso crescimento.

Agradeço minhas conquistas pessoais, as amizades que estar nesta cidade maravilhosa me proporcionaram e todo processo de amadurecimento que vivenciei durante estes anos. Muito obrigada Allan Peres da Silva, Márcia Paschoal, Diogo Gama, Oscar Araújo, Diego Marins, Denison Rangel e Amanda Calvão. Em especial, agradeço as amigas Ana Carolina Mendonça, Cristiane Bezerra, Larissa Gomes e Maria Augusta Dario. Meninas e meninos, o carinho e presença de vocês em minha vida é motivo de muita alegria. Obrigada por serem tão especiais e pacientes!

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma compartilharam comigo um pouco de suas vidas e/ou conhecimento durante estes anos acadêmicos. Muito obrigada!

*“Sei que podes fazer todas as coisas;
nenhum dos teus planos pode ser
frustrado” Jó 42:2*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

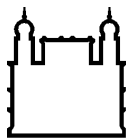
AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS RELACIONADOS À VITAMINA D E RESISTÊNCIA INSULÍNICA EM PACIENTES MONOINFECTADOS COM HCV RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Letícia de Paula Scalioni

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) tem sido relacionada a distúrbios metabólicos. O objetivo geral deste estudo foi determinar a prevalência de hipovitaminose D e polimorfismos genéticos associados com a vitamina D e avaliar se as mutações nas posições 70 e 91 do core estão associadas a presença de resistência insulínica (RI), a fim de fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o tratamento desta infecção. Foram incluídos 237 pacientes com HCV para determinação dos níveis sérico de 25(OH)D e compará-los com dados virológicos e laboratoriais, bem como resposta virológica sustentada (RVS) à terapia antiviral. Para a avaliação dos polimorfismos genéticos relacionados aos genes VDR e GC, um total de 148 pacientes com HCV foram recrutados. A análise de discriminação alélica foi realizada usando os ensaios TaqMan e os SNPs analisados foram: VDR-rs7975232 (ApaI) C> A, rs731236 A> G (TaqI), rs1544410 C> T (BsmI), rs10735810 T> C (FokI) e GC-rs4588 e rs7041 e o haplótipo bAt [CCA]. Para a avaliação da prevalência de RI em pacientes com HCV, 214 pacientes não diabéticos foram estudados. A insulina foi quantificada usando imunoensaio de quimioluminescência. A RI foi determinada pelo HOMA-RI, onde HOMA-RI > 2 foi definido como resistente. Por fim, para a avaliação da associação entre mutações nas posições 70 e 91 do core do HCV com o desenvolvimento de RI, 92 pacientes com HCV não tratados foram recrutados. As mutações avaliadas foram determinadas por sequenciamento direto de nucleotídeos. Como resultado, observamos prevalência de hipovitaminose D em 66,2% dos pacientes com HCV, enquanto que entre os pacientes com RVS, a maioria (55,9%) apresentou 25(OH)D superior a 30ng/mL. Na avaliação dos fatores genéticos do hospedeiro, foi observada uma associação significativa entre 25(OH)D \geq 20 ng/mL e AST [p = 0,019 (CI: 1,003 - 1,034)], colesterol total [p = 0,038 (CI: 1,004 - 1,164)], grau de fibrose [p < 0,001 (CI: 0.000 - 0.844)], e presença de alelo FokI (p = 0,028). Também encontramos associação entre BsmI e algoritmo de fibrose; TaqI e triglicerídeos e algoritmo de fibrose; FokI e HDL; GC rs4588 e tratado e não tratado e, GGT e; GC rs7041 com o genótipo 1 e não-1. Na avaliação da prevalência de RI, 62,1% apresentaram HOMA > 2 e a RI foi associada a valores médios mais elevados de idade (p = 0,040), triglicerídeos (p = 0,032), glicose (p = 0,000), insulina (p = 0,000), circunferência abdominal (p = 0,001) e índice de massa corpórea (p = 0,007). Em relação às mutações na região do core, a presença de glutamina na posição 70 foi associada à baixa concentração de vitamina D (p = 0,005). Concluimos que a deficiência de vitamina D é comum entre os pacientes brasileiros infectados com HCV e não está associada à RVS. O polimorfismo de SNPs de VDR e GC foi associado a concentração de vitamina D, grau de fibrose e tipo de genótipo do HCV. Observamos alta prevalência de RI entre os pacientes com HCV, demonstrando que esta população pode estar com maior risco de desenvolver diabetes mellitus tipo 2. Não houve associação entre mutações nos aminoácidos 70 e 91 do core do HCV e a presença de RI, o que sugere que a variabilidade genética desta região tem pouco impacto na RI.

Palavras-chave: vitamina D, polimorfismo, resistência insulínica, core, HCV.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVALUATION OF SERUM LEVELS AND GENETIC POLYMORPHISMS RELATED TO VITAMIN D AND INSULIN RESISTANCE IN HCV MONOINFECTED PATIENTS

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Leticia de Paula Scalioni

Hepatitis C virus (HCV) infection has been linked to metabolic disorders. The general aim of this study was to determine the prevalence of vitamin D deficiency and genetic polymorphisms associated with vitamin D and to evaluate whether the mutations in 70 and 91 core aminoacids positions are associated with the presence of insulin resistance (IR) in order to provide subsidies for development of more effective strategies for the treatment of this infection. A total of 237 HCV patients were included for 25(OH)D levels baseline determination and comparison with virological and laboratory data as well as sustained virological response (SVR) to antiviral therapy. For VDR and GC gene polymorphisms evaluation, a total of 148 patients with HCV were recruited, where 20 ng/mL was considered hypovitaminosis threshold. Allelic discrimination analysis was performed using TaqMan assays and SNPs analyzed were: VDR-rs7975232 (ApaI) C> A, rs731236 A> G (TaqI), rs1544410 C> T (BsmI), rs10735810 T> C (FokI) And GC-rs4588 and rs7041 and the haplotype bAt [CCA]. 214 nondiabetic patients were studied to evaluate the insulin resistance (IR) in HCV patients. Insulin was quantified using chemiluminescent immunoassay. RI was determined by HOMA-RI, where HOMA-RI > 2 was defined as resistant. Finally, for the evaluation of core 70 and 91 aa mutation and the association with IR, 92 HCV untreated patients were recruited. The mutations evaluated were determined by direct nucleotide sequencing. As results, we observed a prevalence of hypovitaminosis D in 66.2% of HCV patients, whereas among patients with SVR, the majority (55.9%) had 25(OH)D higher than 30ng / mL. In the evaluation of host genetic factors, we found a significant association between 25 (OH) D \geq 20 ng/mL and AST [p = 0.019 (CI: 1.003 - 1.034)], total cholesterol [p = 0,038 (CI:1.004 - 1.164)], fibrosis grade [p <0.001 (CI: 0.000 - 0.844)], and presence of FokI allele (p = 0.028). We also found an association between BsmI and fibrosis algorithm; TaqI and triglycerides and fibrosis algorithm; FokI and HDL; GC rs4588 and treated and untreated and; GGT and; GC rs7041 with genotype 1 and no-1. In the evaluation of IR prevalence, 62.1% presented HOMA > 2 and IR was associated with higher mean values of age (p = 0.040), triglycerides (p = 0.032), glucose (p = 0.000), insulin (p = 0.000), abdominal circumference (p = 0.001) and body mass index (p = 0.007). Regarding the mutations in the core region, the presence of glutamine at position 70 was associated with a low concentration of vitamin D (p = 0.005). We conclude that vitamin D deficiency is common among Brazilian HCV infected patients and is not associated with SVR. The polymorphism of VDR and GC SNPs was associated with vitamin D concentration, fibrosis grade, and HCV genotype type. We observed a high prevalence of IR among patients with HCV, demonstrating that this population may be at greater risk of developing type 2 diabetes mellitus. There was no association between mutations at amino acids 70 and 91 and, suggesting that the genetic variability of this region has little impact on IR.

Key words: vitamin D, polymorphism, insulin resistance, core, HCV.

ÍNDICE

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Histórico	14
1.2 Estrutura Viral	15
1.3 Genoma Viral	17
1.3.1 Proteínas Estruturais	18
1.3.1.1 Core	18
1.3.1.2 Envelope (E1 e E2)	20
1.3.2 Proteínas Não Estruturais	22
1.3.2.1 p7	22
1.3.2.2 NS2	23
1.3.2.3 NS3	23
1.3.2.4 NS4	24
1.3.2.5 NS5A	24
1.3.2.6 NS5B	25
1.4 Replicação	26
1.5 Diversidade Genética	29
1.6 Patogênese do HCV	32
1.7 Epidemiologia	37
1.8 Transmissão e Prevenção	39
1.9 Diagnóstico	41
1.9.1 Diagnóstico Sorológico	41
1.9.2 Diagnóstico Molecular	42
1.10 Tratamento	43
1.11 Metabolismo do Fígado	47
1.12 Sistema Homornal da Vitamina D	48
1.13 Receptor da Vitamina D (VDR)	51
1.14 Vitamina D vs. Hepatite C Crônica	52
1.15 Ação da Insulina	56
1.16 Resistência Insulínica e HCV	57

2	JUSTIFICATIVA	62
3	OBJETIVO GERAL	64
	3.1 Objetivos Específicos	64
4	RESULTADOS	65
5	DISCUSSÃO	130
6	CONCLUSÃO	143
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURA DO HCV	17
FIGURA 2. GENOMA DO HCV	18
FIGURA 3. DOMÍNIOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO CORE DO HCV	20
FIGURA 4. CICLO DE REPLICAÇÃO DO HCV	28
FIGURA 5. DIVERSIDADE GENÉTICA DO HCV	30
FIGURA 6. PREVALÊNCIA RELATIVA DE CADA GENÓTIPO DO HCV DE ACORDO COM O GBD	32
FIGURA 7. CURSO CLÍNICO DA INFECÇÃO PELO HCV	34
FIGURA 8. SÍNTESE DA FORMA HORMONAL 1,25-DIIDROXIVITAMINA D	49
FIGURA 9. MECANISMO DE ATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE VITAMINA D (VDR)	51
FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VDR E SEUS PRINCIPAIS POLIMORFISMOS	52
FIGURA 11. ALTERAÇÕES METABÓLICAS ASSOCIADAS AO VÍRUS DA HEPATITE C NO HEPATÓCITO	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

HBV	Virus da Hepatite B
HCV	Virus da Hepatite C
HAV	Virus da Hepatite A
HIV	Virus da Imunodeficiência Humana
CMV	Citomegalovirus
HPT	Hepatite pós-transfusional
HNANB	Hepatite não A não B
E1	Proteína do envelope 1
E2	Proteína do envelope 2
ORF	<i>open reading frame</i>
UTR	<i>untranslated regions</i>
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
SP	peptidase sinal do hospedeiro
aa	aminoácido
ARFP	<i>alternative reading frame protein</i>
LD	<i>lipid droplets</i>
ATP	trifosfato de adenosina
Apo	apolipoproteína
RNA	ácido ribonucleico
SOF	sofosbuvir
miR-122	micro RNA 122
NK	natural killer
dsRNA	<i>double strand RNA</i>
IFN	interferon
TLR-3	<i>Toll like receptor 3</i>
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
RI	resistência insulínica
DIV	drogas intravenosas
PCR	reação em cadeia da polimerase
SVR	<i>sustained virological response</i>
PEG-IFN	interferon peguilado

25(OH)D	25-hidroxi-Vitamina D
1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-diidroxi-Vitamina D
VDR	receptor da vitamina D
DBP	<i>Vitamin D binding protein</i>
IL-28	interleucina 28
LDL	lipoproteína de baixa densidade
VLDL	<i>very low density protein</i>
GC	globulina carreadora
HOMA	<i>homeostatic model assessment</i>
Huh-7	células de hepatoma humano
Caco-2	células de adenocarcinoma colorretal
HepG-2	células de carcinoma hepatocelular
UDI	usuário de droga intravenosa
CTL	linfócito T citotóxico
PLSCR1	fosfolípídeo scramblase 1
SLC25A5	<i>adenine nucleotide translocator 2 (fibroblast) [solute carrier family 25 member 5]</i>
NDUFS2	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2</i>
ETFB	electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide
FTL	gene da cadeia leve da L-Ferritina
ENO1	alpha enolase
bDNA	branched DNA

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Até o final da Segunda Guerra Mundial apenas dois tipos de hepatites virais, com diferentes meios de transmissão (parenteral e entérico), haviam sido descobertos. Os agentes etiológicos das hepatites A e B foram identificados no início da década de 70 e com o desenvolvimento de testes sorológicos sensíveis a esses agentes, foi possível observar que muitos casos de hepatite pós-transfusional não eram atribuíveis à infecção pelo vírus da hepatite A (HAV) ou pelo vírus da hepatite B (HBV). Dessa forma, foi descrito pela primeira vez uma nova hepatite pós-transfusional (HPT), chamada de hepatite “não-A não-B”(HNANB) (Feinstone *et al*, 1975).

Após a implementação de medidas preventivas, na década de 70, como a exclusão de doação de sangue remunerada e/ou de portadores de HBsAg reagentes, foi possível observar uma redução de aproximadamente 85% do número de casos de hepatite pós-transfusional (HPT) (Alter *et al*, 1972). Mesmo com a adoção destes critérios, o número de casos de HPT continuou a ser notificado e sabidamente não estavam relacionados ao vírus HAV e HBV, bem como a outros agentes hepatotrópicos como o Citomegalovírus (CMV) e vírus Epstein-Barr (EBV) (Alter *et al*, 1975).

A ausência de marcador sorológico associado à infecção pelo(s) agente(s) da HNANB dificultou a investigação etiológica da HNANB. No final dos anos 70, diferentes grupos de pesquisadores demonstraram ser possível a transmissão experimental dos agentes da HNANB aos chimpanzés através da administração parenteral de material infeccioso humano (soro, plasma, hemoconcentrado) (Hollinger *et al*, 1978; Alter *et al*, 1978; Tabor *et al*, 1978; Bradley *et al*, 1979; Bradley *et al*, 1980; Hollinger *et al*, 1984; Bradley *et al*, 1985).

Em estudo realizado por Alter *et al*. (1978) onde amostras de plasma ou soro de pacientes com infecção aguda ou crônica NANB foram inoculadas em 5 chimpanzés, foi possível observar evidências bioquímicas e histológicas de hepatite, porém não houve evidência sorológica de hepatite tipo A ou tipo B. A hepatite havia sido transmitida pelo soro derivado de pacientes com hepatite crônica, bem como aguda, sugerindo fortemente um estado de portador crônico para o agente responsável pela hepatite “não-A não-B”. Portanto, era sabido que o agente transmissível poderia persistir e permanecer infeccioso por longos

períodos.

Foi observado que pelo menos 10% das transfusões sanguíneas resultavam em hepatite NANB (AACH *et al*, 1991), causando dano hepático persistente e evoluindo em pelo menos 20% dos casos para cirrose hepática nas infecções crônicas (Hoofnagle & Alter, 1985). Além disso, uma parcela dos casos ocorria esporadicamente na comunidade e não estava associada necessariamente à transfusão sanguínea e à recepção de derivados do sangue (Alter *et al*, 1982). Estudos posteriores tornaram evidente a natureza viral do agente etiológico da HNANB (Bradley *et al*, 1979; Bradley *et al*, 1980; Hollinger *et al*, 1984). Em 1989, o vírus da hepatite C (HCV) foi descrito por Choo *et al*. (1989). Em 1989, o principal agente etiológico das hepatites NANB foi descrito por Choo *et al*. (1989) a partir do isolamento de vários clones de cDNA por meio de hibridações que se justapunham, utilizando estudos de clonagem e sequenciamento genético.

A partir da identificação do agente etiológico da hepatite NANB e utilização de testes de detecção de anticorpos anti-HCV (utilizando peptídeos recombinantes) (Kuo *et al*, 1989), foi possível esclarecer que os casos clínicos de hepatite pós-transfusional NANB (Alter *et al*, 1989) tinham como responsável o HCV.

1.2 Estrutura Viral

Através de comparações filogenéticas das seqüências virais, o vírus da hepatite C foi classificado dentro do gênero *Hepacivirus*, na família *Flaviviridae* (Choo *et al*, 1991; Simmonds, 2004).

O membro mais caracterizado do gênero *Hepacivirus* é o vírus da hepatite C, o qual recentemente foi renomeado como espécie *hepacivirus C* (Smith *et al*, 2016; ICTV, 2017). Os *hepacivírus* diferem dos membros dos gêneros *Flavivirus* e *Pestivirus* por sua capacidade limitada de serem propagados em cultura celular, uma vez que apenas algumas estirpes adaptadas de HCV, incluindo JFH1, infectam eficientemente uma única linhagem celular suscetível, células de hepatoma humano (Huh7). A cultura celular de outros *hepacivírus* não foi alcançada até à data (ICTV, 2017). O vírus é estável em tampão com pH 8.0-8.7. Os virions são sensíveis ao calor, solventes orgânicos e detergentes (ICTV, 2017).

O HCV é um vírus envelopado que possui estrutura genômica composta por uma fita simples de RNA de polaridade positiva com aproximadamente 9.400 nucleotídeos (Choo *et al*, 1991; Hoffmann *et al*, 2012; ICTV, 2017). A partícula viral tem diâmetro aproximado de 70nm (He *et al*, 1987; Simmonds, 2004; ICTV, 2017), estrutura tridimensional análoga à dos Flavivírus e simetria icosaédrica, com espículas de 6-8 nm em sua superfície (Prince *et al*, 1996; ICTV, 2017). As partículas virais apresentam elevada heterogeneidade bioquímica pela sua associação com anticorpos ou lipoproteínas (Roingeard *et al*, 2004; ICTV, 2017), tendo em vista que os vírions podem circular na corrente sanguínea complexados às lipoproteínas de baixa densidade, às imunoglobulinas, ou como partículas livres (Lindenbach, 2013; ICTV, 2017).

A análise estrutural do vírus revelou que o material genético é envolto por um nucleocapsídeo, composto principalmente por proteínas do core, e ainda protegido por um envelope lipídico (Rosenberg *et al*, 2001; ICTV, 2017). O envelope lipídico contém duas glicoproteínas principais incorporadas a sua estrutura: proteínas do envelope 1 (E1) e 2 (E2) (Op De Beeck *et al*, 2003; ICTV, 2017).

O genoma é constituído por uma única fase de leitura aberta (ORF – *open reading frame*), que codifica uma poliproteína de cerca de 3000 aminoácidos (3010 – 3033 aa), a qual durante e após a tradução, sofre uma série de clivagens por proteases virais e do hospedeiro produzindo proteínas estruturais (E1, E2 e core) e não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (Choo *et al*, 1991; Valoup-Fellous *et al*, 2006; ICTV, 2017). Além disso, é flanqueado por duas regiões não traduzidas que são essenciais na replicação e síntese das proteínas virais: a extremidade 5', que é a mais conservada do genoma viral e contém o sítio interno de entrada ribossomal (IRES – *internal ribosome entry site*), e a extremidade 3', que apresenta a cauda poli-U, uma estrutura crítica para o início da replicação viral (Choo *et al*, 1991; ICTV, 2017).

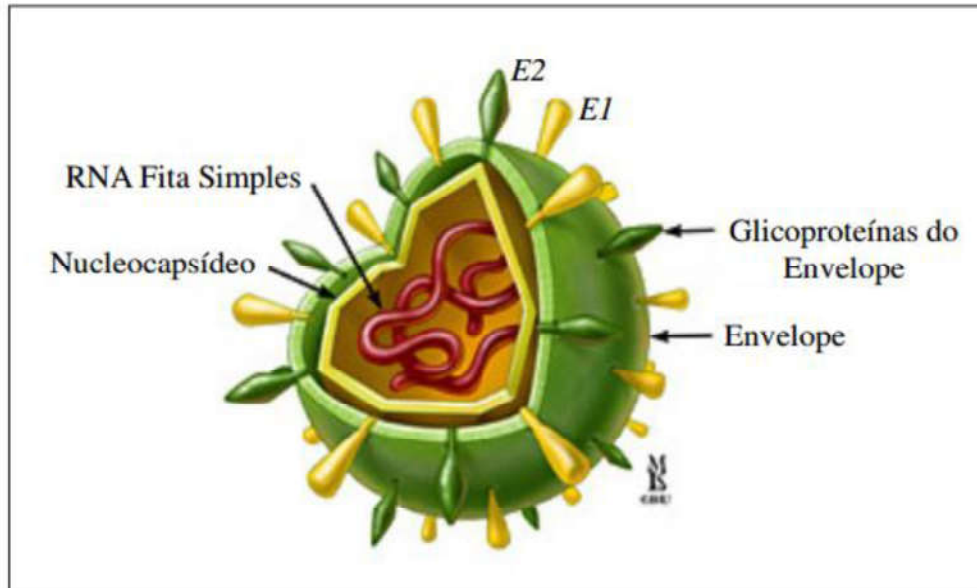


Figura 1. Estrutura do HCV. As partículas do vírus da hepatite C tem diâmetro estimado de 70 nm. Estruturalmente, apresentam um RNA fita simples de polaridade positiva envolto por proteínas do core que formam seu nucleocapsídeo. Na superfície do nucleocapsídeo encontra-se o envelope, de composição lipoglicoprotéica, contendo dois tipos de glicoproteínas denominadas E1 e E2. Disponível em: www.hopkins-gi.org [Acesso:11/06/2017].

1.3 Genoma Viral

A poliproteína precursora é clivada em diversas proteínas individuais mediante a ação de proteases virais e celulares. O segmento amino terminal da ORF representa 25% do genoma e é processado pela peptidase sinal do hospedeiro para então produzir a proteína do nucleocapsídeo (core) e duas glicoproteínas do envelope (E1 e E2). Os 75% restantes do genoma codifica as proteínas não estruturais p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, as quais sofrem ação das proteases virais (Lohmann 2013; ICTV, 2017) (Figura 2).

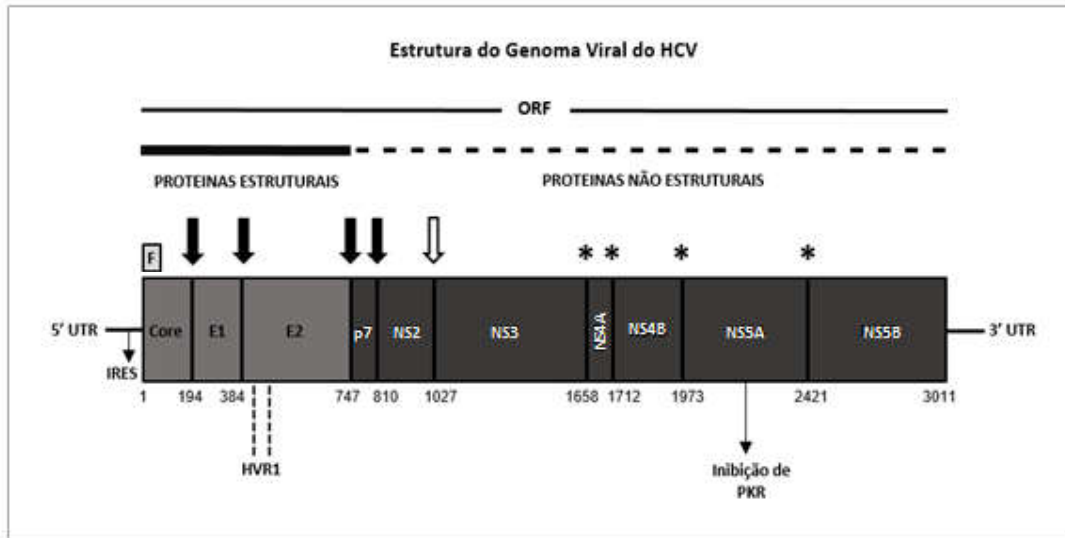


Figura 2. Estrutura do Genoma Viral do HCV. Representação da fase de leitura aberta (ORF – *open reading frame*) codificando genes estruturais e não-estruturais com as regiões 5' e 3' UTR (*untranslated region*). A seta escura refere-se ao sítio de atuação da peptidase celular; a seta clara a atuação da autoprotease NS2-NS3; os asteriscos são sítios de atuação da protease NS3-NS4A; F refere-se a proteína F; IRES, sítio interno de entrada ribossomal (IRES – *internal ribosome entry site*); HVR1: região hipervariável.

1.3.1 Proteínas estruturais

1.3.1.1 Core

A proteína do core é composta por 191 aa (peso molecular ~21 kDa) que constituem o capsídeo viral e que associam-se, provavelmente, pela porção N-terminal ao RNA genômico para formar o nucleocapsídeo (Drazan 2000). É o primeiro domínio expresso durante a síntese da poliproteína. Não é glicosilada e comparada a outras proteínas do HCV, é a mais conservada. Resultados de análises de sequências obtidas de diversas estirpes demonstraram homologia de 81% a 88% em sequências nucleotídicas e 96% em sequências de aminoácidos (Simmonds *et al*, 1994; Davis *et al*, 1999).

O core é clivado no resíduo 191 pela peptidase sinal do hospedeiro (SP) onde é destacado da poliproteína precursora. Esta proteína imatura é adicionalmente clivada pela peptidase celular SP (SPP) dentro da região C-terminal transmembranar para gerar a proteína madura e o peptídeo clivado. A clivagem da proteína do core do HCV por SPP é essencial para a montagem do vírus (Santolini *et al*, 1994; Okamoto *et al*, 2008). Assim, a clivagem entre

proteínas do core e E1 por SP facilita ainda mais a clivagem da proteína do core por SPP (Ma *et al*, 2007).

O resíduo de aminoácido da região C-terminal da proteína madura e sua associação ao virion não é conhecido. Estudos onde a expressão de proteínas do core são feitos em células de insetos tem indicado que SPP cliva após o resíduo 177 (Ogino *et al*, 2004), 179 ou 182 (Hüssy *et al*, 1997), e os estudos em células humanas suportam que a proteína madura termina no resíduo 177 (Okamoto *et al*, 2008).

A proteína madura é constituída por uma região de ligação RNA-terminal (Domínio I, ~120 aminoácidos) e uma região C-terminal de ligação à membrana (Domínio II, ~50 aminoácidos). As proteínas do core formam homodímeros e multímeros que são estabilizados por ligações intermoleculares de dissulfeto (Kushima *et al*, 2010) sendo capaz de se agrupar espontaneamente para formar o capsídeo viral e interagir com as glicoproteínas do envelope E1 e E2 (Forns *et al*, 1999). Em sua região C-terminal há uma sequência de 20 aa com função de sinalização que direciona a glicoproteína E1 ao retículo endoplasmático granular (Forns *et al*, 1999).

Outra proteína sem a sequência C-terminal do core maduro, de 17 kDa, com cerca de 160 aminoácidos também foi descrita (Xu *et al*, 2001). Essa proteína é codificada por uma fase de leitura alternativa denominada ARF (*Alternative Reading Frame*), com fase de leitura +1 em relação à proteína core, e foi denominada proteína F ou ARFP (*Alternative Reading Frame Protein*) (Li *et al*, 2014). Esta proteína parece estar envolvida no processo de replicação do HCV, aumento de hepatócitos e regulação do metabolismo de ferro, embora sua expressão durante a infecção natural ainda não esteja totalmente esclarecida (Li *et al*, 2014) Figura 3.

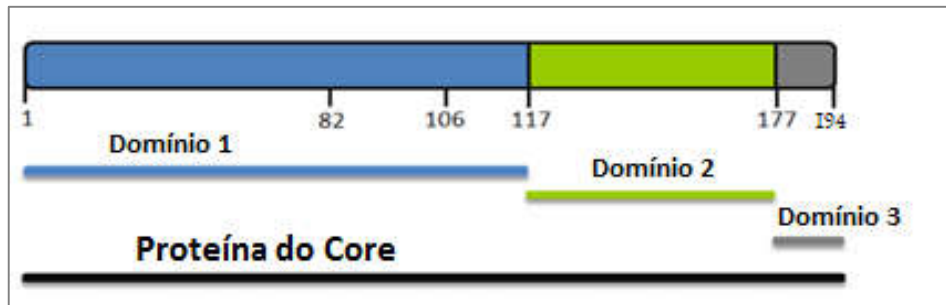


Figura 3. Domínios estruturais e funcionais do core do HCV. O core é formado por um polipéptido de 194 resíduos e é clivado por um peptídeo sinal, até se transformar em uma proteína madura de 177 resíduos. (Strosberg *et al*, 2010).

1.3.1.2 Envelope (E1 e E2)

As glicoproteínas do envelope viral E1 (35 kDa) e E2 (70 kDa) são as principais proteínas estruturais expressas na superfície das partículas virais do HCV. Elas são produzidas a partir de clivagem enzimática e estão envolvidas nos processos de interação com o receptor e fusão celular (Grakoui *et al*, 1993; Takikawa *et al*, 2000).

Durante a sua síntese, E1 e E2 são translocadas para o retículo endoplasmático (RE), onde interagem para formar heterodímeros não covalentes (Dubuisson *et al*, 1994; Duvet *et al*, 1998; Rouillé *et al*, 2006). A dimerização de E1 e E2 é mediada através de seu domínio transmembrana C-terminal (Op De Beeck *et al*, 2000; Patel *et al*, 2001; Ciczora *et al*, 2005; Ciczora *et al*, 2007) e regiões dentro de seus ectodomínios (Yi *et al*, 1997; Drummer e Pountourios 2004; Albecka *et al*, 2011). A formação do heterodímero é um processo lento (Michalak *et al*, 1997; Patel *et al*, 2001; Brazzoli *et al*, 2005) onde a dobragem de cada glicoproteína é dependente de outra, bem como nas chaperonas celulares (Dubuisson e Rice, 1996).

O ectodomínio de E2 pode dobrar-se de forma independente em um modelo quase original que é reconhecido por receptores celulares e anticorpos de conformação específica. A caracterização do ectodomínio recombinante de E2 mostrou que este contém três domínios ricos em folhas β -pregueadas (Whidby *et al*, 2009; Krey *et al*, 2010). Além disso, a estrutura geral de E2 é a mesma, tanto em pH ácido quanto neutro, sugerindo que E2 não sofre alterações de conformação dependentes de pH. A proteína E1 não realiza seus dobramentos na

ausência de E2, porém pouco se sabe sobre a estrutura de seu ectodomínio (Whidby *et al*, 2009; Krey *et al*, 2010).

Em culturas de células de hepatoma humano (Huh-7) e outras linhagens, os heterodímeros E1 e E2 são retidos no retículo endoplasmático. Os principais determinantes dessa retenção são os domínios transmembrana destas proteínas (Dubuisson *et al*, 1994; Cocquerel *et al*, 1998; Duvet *et al*, 1998; Cocquerel *et al*, 1999; Cocquerel *et al*, 2002; Ciczora *et al*, 2005; Rouillé *et al*, 2006; ICTV, 2017). No entanto, quando expressos em culturas Caco-2 (células de adenocarcinoma colorretal) ou HepG2 (células de carcinoma hepatocelular), uma fração dos heterodímeros de E1 e E2 são segregados em associação a proteínas quilomicron-like e VLDL-like, respectivamente (Icard *et al*, 2009). Estes dados sugerem que as glicoproteínas do HCV contêm regiões indeterminadas de associação a lipoproteínas (Icard *et al*, 2009).

O desenvolvimento do sistema de cultura celular do HCV (HCVcc) permitiu a caracterização parcial das formas funcionais de E1 e E2. Foi observado que tanto E1 quanto E2 apresentam elevado teor de manose e complexos N-glicanos, indicando trânsito das partículas através do complexo de Golgi (Vieyres *et al*, 2010). Embora E1 e E2 formem heterodímeros intracelulares não covalentes, E1 e E2 associados ao virion são encontrados naturalmente dobrados ligados por complexos de dissulfeto (Vieyres *et al*, 2010). Estas ligações covalentes podem contribuir para a resistência do HCV em meio ácido e, sugere que o arranjo de dissulfeto é necessário para fusão das partículas de HCV em pH baixo (Tscherne *et al*, 2006).

Em termos antigênicos, a proteína E2 apresenta uma região hipervariável (HVR1) que pode induzir a produção de anticorpos neutralizantes, funcionando como um mecanismo de escape, evadindo desta forma da resposta imune do hospedeiro (Bukh *et al*, 1995; Penin *et al*, 2004; Lyra *et al*, 2004; ICTV, 2017). A HVR1 desempenha papel importante na evolução da infecção pelo HCV. Os casos de resolução na fase aguda apresentam menor variabilidade (nas sequências de E2) dentro de um mesmo paciente em relação àqueles casos que evoluem para hepatite crônica (Chen & Wang 2007; ICTV, 2017).

Além disso, a proteína E2 apresenta um sítio de ligação para CD81, que é uma proteína de membrana (26 kDa), encontrada em diversas células, incluindo hepatócitos, células do sistema imune, fibroblastos e células endoteliais e, podem

participar do processo de penetração do HCV nessas células. Além da interação das proteínas E2 com CD81 para penetração nos hepatócitos, o HCV ainda utiliza o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL-R) (Chen & Wang, 2007, ICTV, 2017). A ligação com LDL-R e o receptor *scavenger* (SR-B1) leva a mudanças conformacionais na partícula viral permitindo o envolvimento de outros co-receptores de membrana do hepatócito (CD 81, claudina-1 e ocludina) (Jahan *et al*, 2011; ICTV, 2017). As proteínas E1 e E2 ainda são os principais alvos para produção de vacinas e têm sido bastante estudadas quanto à sua variabilidade, sendo a proteína E1 também utilizada em propósitos clínicos de diagnóstico em testes de genotipagem (Chen & Wang 2007).

1.3.2 Proteínas não estruturais

1.3.2.1 p7

A proteína p7 é um polipeptídeo de 63 aa que é parcialmente clivado a partir de E2. É composta por um pequeno fragmento hidrofóbico (hexâmeros) que tem atividade de canal iônico e pode ter um importante papel na maturação e liberação da partícula viral. Sua necessidade para a replicação do HCV em chimpanzés, confirma a proteína como possível alvo para a quimioterapia antiviral, já que está relacionada a apoptose celular, maturação e liberação da partícula viral (Sakai *et al*, 2003; Roingeard *et al*, 2004; Aweya *et al*, 2012).

Inicialmente, a proteína p7 é necessária para a montagem do vírus por meio da interação com NS2 (Jirasko *et al*, 2010; Boson *et al*, 2011; Ma *et al*, 2011; Popescu *et al*, 2011; Stapleford e Lindenbach 2011; Tedbury *et al*, 2011; ICTV, 2017). Seu segundo papel importante envolve sua capacidade de oligomerizar e formar canais iônicos hexaméricos e heptaméricos específicos para cátions (Montserret *et al*, 2010). Dessa forma, a proteína p7 é capaz de equilibrar o pH dentro dos compartimentos secretórios e endolisossomais das células produtoras de vírus (Wozniak *et al*, 2010). Foi observado que na ausência desta proteína, as partículas virais não foram produzidas, sugerindo fortemente que sua atividade de canal iônico (atuação como viroporina) protege as partículas virais da exposição prematura ao baixo pH durante a maturação e saída de vírus (Wozniak *et al*, 2010; ICTV, 2017).

1.3.2.2 NS2

A proteína NS2 é uma proteína não-estrutural zinco-dependente de 23 kDa que contém três domínios N-terminais transmembrana e um domínio cisteína protease C-terminal (Jirasko *et al*, 2010; ICTV, 2017). É a primeira protease viral ativada pelo polipeptídeo e responsável pela clivagem (ação cis) da junção NS2/NS3 (NS2/NS3 protease) e pela maturação das proteínas NS restantes (Dumoulin *et al*, 2003). Até hoje, poucas propriedades foram atribuídas a NS2 clivada madura, visto que ela parece agir inibindo a apoptose, modulando a expressão gênica e também, na fosforilação de NS5A (Franck *et al*, 2005). Sabe-se também, que a atividade de protease da NS2 é fundamental para que ocorra a replicação completa do HCV *in vivo*, entretanto a mesma é dispensável para replicação do vírus *in vitro* (Roingeard *et al*, 2004, Jirasko *et al*, 2008; ICTV, 2017).

1.3.2.3 NS3

A proteína NS3 (serina protease específica) é uma proteína não-estrutural hidrofílica de aproximadamente 70 kDa. Esta proteína multifuncional, desempenha um papel importante no ciclo replicativo do HCV. A NS3 apresenta atividade serina-protease (NS3/4A) na região N-terminal de todas as junções à jusante, porém para que a clivagem (ação trans) da poliproteína seja eficiente é necessária a presença do cofator NS4A, principalmente no sítio NS4B/NS5A (Brass *et al*, 2006). Além disso, apresenta atividade de helicase (RNA-helicase/NTPase) na extremidade C-terminal, com função de separar o RNA de cadeia dupla, a partir de uma reação alimentada por hidrólise de ATP produzido durante a replicação do RNA viral (De Francesco *et al*, 2000; Raney *et al*, 2010; Salam *et al*, 2014). Embora a função exata da atividade de helicase do ciclo replicativo do HCV não seja bem compreendida, a presença de uma helicase totalmente funcional é essencial para a replicação do RNA. Dessa forma, a porção helicase da NS3 é um alvo válido para o desenvolvimento de terapia antiviral de ação direta (Salam *et al*, 2014).

Acredita-se também, que a NS3 pode estar envolvida direta ou indiretamente na carcinogênese ao interferir na proliferação e morte celular. A

proteína NS3 pode estar também relacionada a outros aspectos da infecção como: interação com a proteína quinase A e C, que participam da transdução de sinais, e do mecanismo patogênico do HCV no desenvolvimento do hepatocarcinoma ao interagir com a proteína p53 (Tellinghuisen *et al*, 2002).

O desenvolvimento de agentes antivirais para o tratamento da infecção pelo HCV tem sido direcionado a produção de pequenas moléculas inibidoras da infecção pelo HCV, que podem atuar diretamente sobre alvos virais ou em outras proteínas-alvo do hospedeiro que sejam críticas para a replicação de HCV. Os dois primeiros agentes de ação direta aprovados foram o telaprevir e boceprevir, que são inibidores da atividade da protease (IP) NS3/4. Entretanto, não são mais comercializadas. Atualmente o simeprevir, também um IP está disponível no mercado (Ghany *et al*, 2011; Salam *et al*, 2014; Gentile *et al*, 2014; Feeney *et al*, 2014; Kanda *et al*, 2014).

1.3.2.4 NS4

A região genômica de NS4 codifica duas proteínas: NS4A (8 kDa) e NS4B (23 kDa). A proteína NS4A é composta por aproximadamente 54 aa e funciona como cofator para serina protease NS3 e é também incorporada como componente integral do core (Roingeard *et al*, 2004; Dubuisson *et al*, 2002). A proteína NS4B (p27), por sua vez, é a proteína viral do HCV menos caracterizada, porém, alguns estudos sugeriram que ela seja responsável por induzir a alterações nas membranas celulares denominadas “teia membranosa” (Roingeard *et al*, 2004; Dubuisson *et al*, 2002; Moradpour & Blum, 2004).

1.3.2.5 NS5A

A proteína NS5A é uma fosfoproteína de ligação ao RNA que desempenha diversos papéis no ciclo de replicação do HCV (ICTV, 2017). Contém três domínios que são separados por regiões de baixa complexidade: domínio I, que se dobra em uma estrutura incomum e realiza a homodimerização; domínio II, conservado, mas naturalmente desdoblado; domínio III, menos conservado e tolerante a grandes inserções e deleções (Lindenbach *et al*, 2013).

A NS5A desempenha papel essencial na montagem da partícula viral em grande parte por seu domínio III, onde ocorre a fosforilação de um resíduo de serina pela caseína-quinase II α (Tellinghuisen *et al*, 2008). Além disso, dados genéticos e bioquímicos indicam que o domínio III codifica fatores determinantes para a associação fraca ou transitória do complexo p7-NS2 (Jirasko *et al*, 2010; Ma *et al*, 2011; Popescu *et al*, 2011; Scheel *et al*, 2012).

A montagem de partículas virais requer o recrutamento de NS5A para LDs, onde interage com proteínas do core (Masaki *et al*, 2008; Rotonya *et al*, 2016). Além de interagir com outras proteínas virais, NS5A interage com ApoE, uma apolipoproteína (apo) que é necessária para a montagem (Benga *et al*, 2010; Cun *et al.*, 2010; Rotonya *et al*, 2016), e anexina A2, uma proteína de membrana que aumenta a montagem viral (Backes *et ai*, 2010; Rotonya *et al*, 2016).

Por ser uma proteína essencial para a montagem e replicação viral, inibidores de NS5A são antivirais potentes e atuam em concentrações picomolares, como o daclatasvir, que é uma droga de ação direta (DAAs) já inserida no novo protocolo de tratamento do HCV no Brasil (Conitec, 2017).

1.3.2.6 NS5B

A região NS5B possui uma sequência semi conservada que codifica uma RNA-polimerase dependente de RNA. Essa enzima não apresenta mecanismos de reparo, o que acarreta uma elevada porcentagem de erros devido à incorporação de nucleotídeos durante a replicação do RNA e desta forma, torna o genoma viral susceptível a inúmeras substituições de nucleotídeos (Forns e Bukh, 1999; ICTV, 2017).

Os sítios para a atividade da proteína NS5B possuem especial afinidade de ligação com segmentos de poli U, como aquele presente na extremidade da região 3' não codificante (NC) do HCV. A existência de um elemento de replicação cis no seu domínio C-terminal, em conjunto com a região 3' NC, garante a iniciação da replicação do genoma completo a partir da região 3' NC (You *et al*, 2004). Dessa forma, torna-se importante a determinação da estrutura do substrato de ligação com NS5B para que inibidores efetivos da RNA polimerase do HCV sejam desenvolvidos (ICTV, 2017).

A NS5B RNA-polimerase dependente de RNA é responsável pela replicação do RNA do HCV (ICTV, 2017). Tal como acontece com os inibidores da transcriptase reversa do HIV, existem duas classes principais de inibidores de NS5B. Estes são os inibidores de nucleosídeos (s), que se ligam ao local ativo da enzima e causa a terminação prematura da cadeia, ou inibidores nucleotídeos (t), que se ligam fora do sítio ativo, mas causam uma alteração conformacional que inibe a atividade da RNA polimerase (Feeney *et al*, 2014).

Nos últimos anos, a pesquisa clínica na área de novos tratamentos para a hepatite C crônica (HCV) tem se dedicado ao desenvolvimento de regimes baseados em antivirais de ação direta, com o objetivo de aumentar a eficácia do tratamento e melhorar a tolerabilidade e segurança. Sofosbuvir (SOF) é o primeiro composto com regimes combinados livre de interferon. Pertence aos inibidores de nucleotídeos do genoma viral e atua na polimerase como um terminador de cadeia durante o processo de replicação do HCV. Além disso, exibe atividade antiviral pan-genotípica com uma elevada barreira à resistência (Degasperi e Aghemo 2014; Conitec, 2017).

1.4 Replicação

A replicação do HCV, mesmo com os avanços no desenvolvimento de cultivos celulares, ainda está pouco esclarecida e o modelo aceito mais utilizado para estudo é aquele baseado na similaridade do ciclo dos vírus pertencentes à família *Flaviviridae*.

O início da replicação ocorre na membrana do hepatócito com a adsorção da partícula viral. Após adsorção, o vírus se internaliza na célula por fusão de membrana ou endocitose mediada por receptor (Cabot *et al*, 2000; Szabó *et al*, 2003; Pawlotsky 2004; Penin *et al*, 2004, Zeisel *et al*, 2011).

Um crescente número de moléculas celulares estão envolvidas na internalização do HCV nos hepatócitos. Acredita-se que o receptor de LDL e glicosaminoglicanas realizam a ligação celular inicial de baixa afinidade (Barth *et al*. 2003; Rotonya *et al*, 2016), antes da interação das proteínas E1 e E2 com os receptores SR-BI (*scavenger receptor class B type I*) e CD81 (Scarselli *et al*, 2002; Falson *et al*, 2015; Rotonya *et al*, 2016). Fatores adicionais como o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e receptor de efrina A2 são

importantes para a entrada do HCV, e possivelmente modulam a interação entre CD81 e claudina-1 (CLDN1) (Lupberger *et al*, 2002; Rotonya *et al*, 2016). As moléculas CLDN1 e ocludina (OCLN) também foram relacionadas à entrada do vírus (Evans *et al*, 2007; Ploss *et al*, 2009; Rotonya *et al*, 2016). Contudo, a associação entre vírion e colesterol parece estar relacionada à fase tardia de entrada do HCV, durante ou antes da fusão, através da interação com o receptor de absorção do colesterol (NPC1L1) (Sainz *et al*, 2012; Rotonya *et al*, 2016).

A internalização do vírus ocorre por endocitose mediada por clatrina, enquanto a fusão requer o pH baixo encontrado nos endossomos (Tscherne *et al*, 2006; Koutsudakis *et al*, 2006; Rotonya *et al*, 2016). Além disso, a proteína E2 do HCV ao se ligar a CD81 é preparada para ativação em ambientes ácidos (Sharma *et al*, 2011; Rotonya *et al*, 2016).

Após internalização e desnudamento, o genoma viral é exposto para assim iniciar a tradução e replicação. O RNA do HCV é usado como RNA mensageiro (RNAm), logo a tradução é iniciada a partir do reconhecimento do sitio interno de entrada ribossomal (IRES) localizado na extremidade 5'NC. A poliproteína resultante é clivada por proteases celulares e virais (NS2/NS3 e NS3/NS4A), produzindo dez proteínas. Enquanto ocorre a tradução, a atividade de RNA-polimerase RNA - dependente (transcriptase) gera uma fita de RNA, de polaridade negativa, complementar ao RNA viral, que serve também de molde para que haja a síntese de novas fitas de RNA de polaridade positiva, que servirão para a formação de novos vírus (Pawlotsky 2004; Penin *et al*, 2004; Rotonya *et al*, 2016; ICTV, 2017).

A RNA polimerase dependente de RNA, NS5B, é a proteína mais importante do complexo de replicação do HCV (ICTV, 2017). A proteína NS3 por sua vez, contém um domínio da superfamília 2 de helicases DExH/D-box, capaz de se ligar ao ácido nucleico e promover translocação 3' - 5' acoplado a hidrólise de ATP (Sheel *et al*, 2013). Embora o papel exato desta função seja desconhecido, esta atividade pode ser importante para a separação dos RNAs recém sintetizados da fita molde (Raney *et al*, 2010). Já a fosfoproteína NS5A consiste em três domínios pouco definidos, porém é essencial para replicação e montagem do vírus (Neddermann *et al*, 2004; Dubuisson *et al*, 2014).

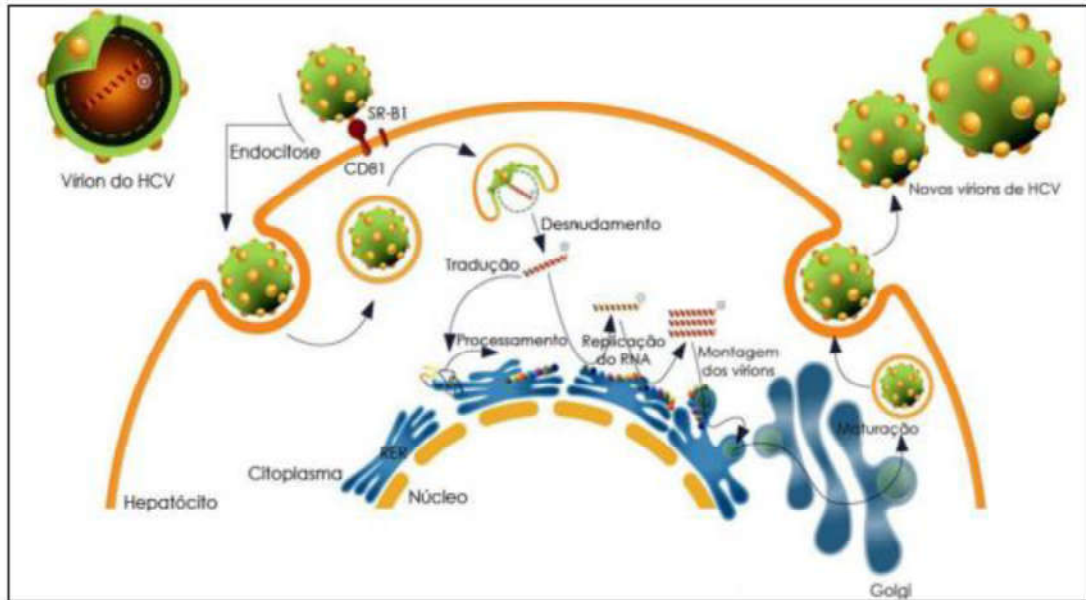


Figura 4. Ciclo de replicação do HCV. Partículas de HCV se ligam à célula hospedeira via interação específica entre as glicoproteínas do envelope e receptores celulares. As partículas ligadas são então internalizadas, provavelmente por meio de endocitose mediada por receptor. Após a liberação do genoma viral no citoplasma (desnudamento) ocorre a tradução, no retículo endoplasmático rugoso (RER) em uma poliproteína que é clivada nas proteínas estruturais e não-estruturais. As proteínas não-estruturais participam da replicação viral e as estruturais fazem parte da estrutura do capsídeo e glicoproteínas do envelope. O local de montagem das partículas virais ainda não foi identificado, mas acredita-se que seja em membranas intracelulares derivadas do retículo endoplasmático ou do compartimento de Golgi. Os vírions recém montados são então liberados da célula hospedeira, por exocitose.

A montagem do vírus é um processo associado a síntese de lipídios da célula (Bartenschlager *et al*, 2011; Rotonya *et al*, 2016). Após a clivagem, a proteína do core madura passa da membrana do RE para gotículas lipídicas citoplasmáticas (CLDS) com auxílio da molécula diacilglicerol aciltransferase-1 (DGAT1) (Herker *et al*, 2010; Rotonya *et al*, 2016). A formação do nucleocapsídeo envolve a interação de NS5A (que também é encaminhada por DGAT1 através de sua α -hélice anfipática N-terminal ou translocada por CLDS) com o core (Rotonya *et al*, 2016). O direcionamento do RNA para os locais de montagem do nucleocapsídeo ainda é mal compreendido, porém é facilitado pela justaposição dos sítios de replicação do RNA e montagem do vírus, e também coordenada através da interação entre as glicoproteínas NS2, p7, NS3 e NS5A (Jirasko *et al*, 2010; Popescu *et al*, 2011). Uma série de sinais são responsáveis pela translocação das proteínas de envelope E1 e E2 pelo RE, as quais assumem

topologia tipo I de proteína de membrana. Após o término da etapa de montagem, a partícula viral montada é então transportada, via complexo de golgi (CG), para ser exocitada da célula hospedeira (Pawlotsky 2004; Khan *et al.*, 2015; Rotonya *et al.*, 2016).

1.5 Diversidade Genética

A replicação do HCV é muito propensa a erros e gera mutações em uma taxa de aproximadamente 10^{-5} por nucleotídeo por replicação, gerando uma elevada diversidade viral (Stumpf & Pybus 2002). Os genótipos de HCV diferem uns dos outros em cerca de 30-35% ao nível de nucleotídeos (Simmonds *et al.*, 2005). Dentro de cada genótipo, há uma série de subtipos, que diferem um do outro em cerca de 15-25%. Embora os genótipos sejam distintos geneticamente, a discriminação de subtipos é menos clara, especialmente em áreas de alta diversidade, como a África subsaariana e o Sudeste Asiático (ICTV, 2017).

São propostos genótipos de 1 a 7, sendo cada um subdividido em subtipos nomeados alfabeticamente, de acordo com a sua ordem de descoberta (Stumpf & Pybus 2002; Simmonds *et al.* 1993; Murphy *et al.* 2007; Smith *et al.* 2014) (Figura 5).

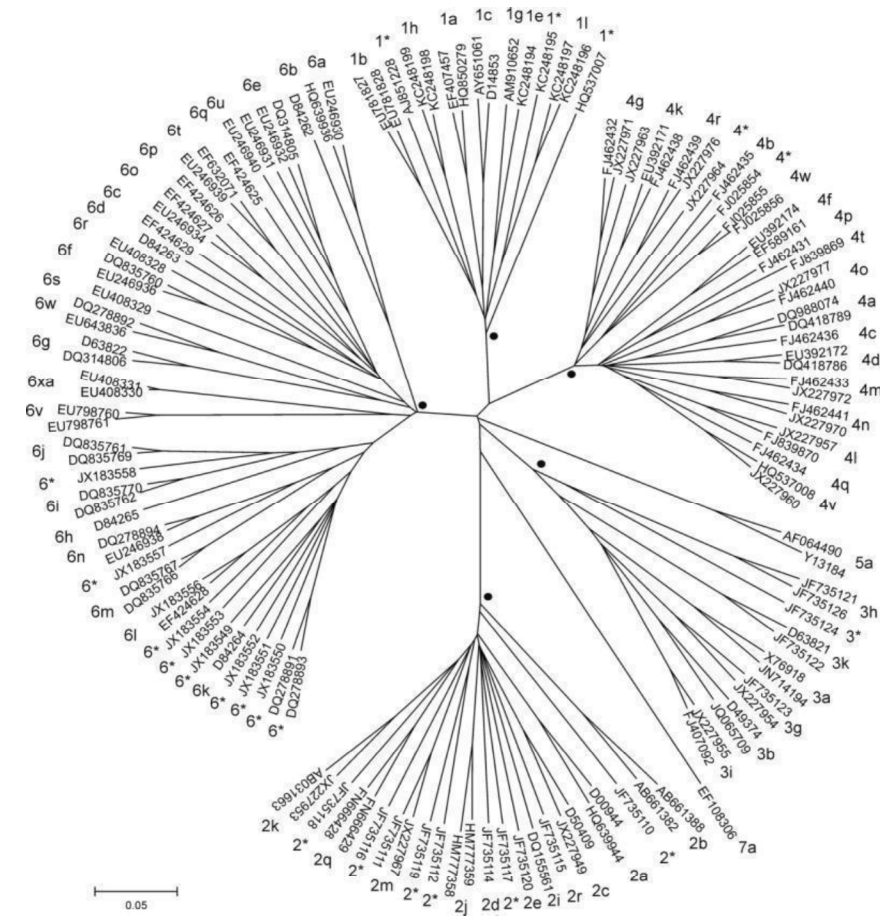


Figura 5. Diversidade genética do HCV. Estudo filogenético de 129 sequências completas do HCV, representando diferentes genótipos/subtipos (1-7). Fonte: Smith *et al*, 2014.

A heterogeneidade genética do HCV faz com que este apresente *quasispécies*, que são vírus com genomas muito semelhantes, porém com homologia entre 90,8% a 99% nas sequências de nucleotídeos (Ueda *et al*, 2004). Esse fenômeno apresenta importante papel no curso da infecção pelo HCV, uma vez que a pressão imunológica seleciona variantes resistentes no hospedeiro (Plauzolles *et al*, 2013).

A elevada variabilidade genética do HCV apresenta implicações clínicas que incluem: I) gravidade da doença hepática, uma vez que a infecção pelo genótipo 1 ou presença de múltiplas quasispecies parece se correlacionar com a maior gravidade; II) influencia na resposta antiviral, seja devido aos genótipos 1 e 4, uma vez que esses genótipos são mais associados a menor resposta ao

tratamento antiviral, ou presença de cepas com mutações de resistência (RAV-*resistant-associated variants*) (Tong *et al*, 2008).

Algumas regiões são potencialmente endêmicas para determinados genótipos tais como: Costa da Guiné na África Ocidental para o genótipo 1, a África Central para o genótipo 2, o Norte do subcontinente indiano para o genótipo 3, a África Central para o genótipo 4 e o Sudeste Asiático para o genótipo 6 (Smith *et al*, 1997). Esses genótipos disseminaram-se por todo o mundo principalmente no século XX como resultado da introdução de determinados fatores de risco, como as transfusões sanguíneas e a partilha de agulhas entre usuários de droga intravenosa (UDI) (Pybus *et al*, 2001; Simmonds, 2004).

Os principais subtipos encontrados nos países industrializados incluem: o subtipo 1a distribuído no Norte da Europa e EUA e fortemente associado a UDIs; o subtipo 1b associado a indivíduos de idade mais avançada e a transfusões sanguíneas no passado; o subtipo 3a distribuído amplamente nos UDIs, particularmente da Europa (Figura 6).

Os subtipos 2a, 2b e 2c, são encontrados nos países mediterrânicos e Extremo Oriente; o subtipo 4a é altamente distribuído na África e no Oriente Médio, onde no Egito é associado ao tratamento massivo da Esquistossomose. O subtipo 5a é prevalente na África do Sul; e o genótipo 6 é encontrado nos UDIs de Hong Kong, Vietnam e também na Austrália (Simmonds, 2004).

No entanto, tem sido verificada uma crescente disseminação do genótipo 4 (subtipos 4a e 4d) em alguns países do Sul da Europa, associado a infecção entre UDIs, co-infecção HCV-HIV e imigração proveniente do Norte de África (Franco *et al*, 2007; Sereno *et al*, 2009).

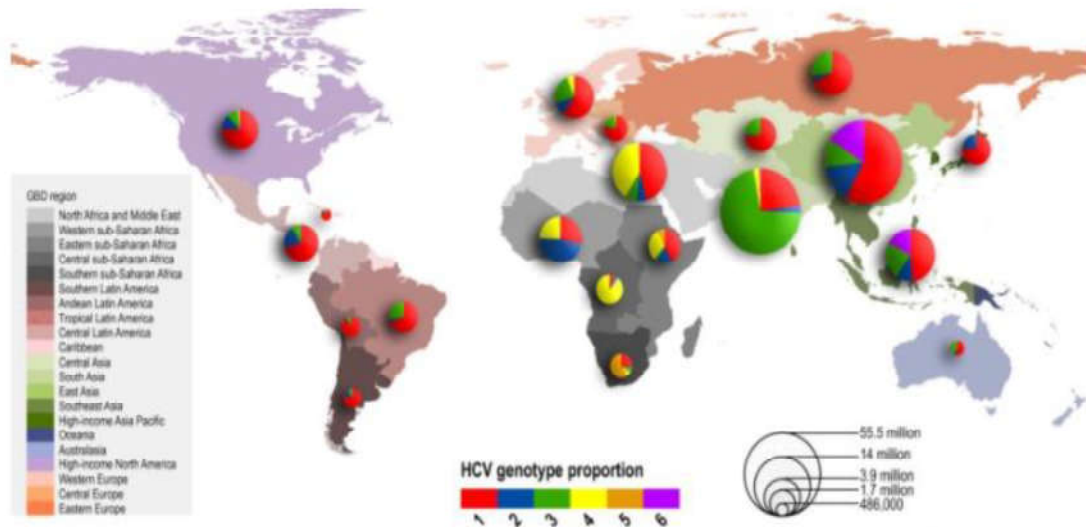


Figura 6. Prevalência relativa de cada genótipo do HCV de acordo com o GBD (Global Burden of Disease Project). O tamanho dos gráficos de pizza é proporcional ao número de casos soroprevalentes estimados. (Messina *et al*, 2015).

No Brasil, análises revelaram que a epidemia brasileira de HCV resultou de introduções múltiplas e transmissão autóctone dos subtipos 1a, 1b, 3a e genótipos 2, 4 e 5. A epidemia brasileira do subtipo 1a do HCV é dominada pela disseminação de um clado importante, enquanto que as epidemias brasileiras de subtipos de HCV 1b e 3a são caracterizadas pela disseminação simultânea de várias linhagens independentes do HCV. Algumas linhagens brasileiras dos subtipos 1a, 1b, 2b e 3a do HCV tiveram sucesso em se estabelecer e disseminar através de várias regiões do país. Apesar do intercalamento filogenético significativo de seqüências brasileiras, a distribuição de cepas de HCV de diferentes estados através de linhagens não é completamente homogênea (Lampe *et al*, 2013).

1.6 Patogênese do HCV

Já foi relatado que o HCV apresenta capacidade de se replicar em células derivadas de hepatócitos e linfócitos, mas o crescimento do vírus só foi eficiente para a aplicação na prática, em linhagem celular de hepatoma humano, células Huh7 e seus derivados. In vivo, o HCV se replica em hepatócitos e possivelmente em linfócitos. Como descrito, a presença de locais de ligação para

o miR-122 (Jopling *et al*, 2005) em outros hepacivírus descritos é consistente com o hepatotropismo generalizado, dada a restrição da expressão deste miRNA ao tecido do fígado (ICTV, 2017).

Além disso, o HCV pode se replicar em outros tecidos, ocasionando manifestações extra-hepáticas, como doenças autoimunes, linfoproliferativas benignas ou malignas (Lingala, 2015). As manifestações extrahepáticas da infecção pelo HCV incluem crioglobulinemia mista com glomerulonefrite membrano-proliferativa associada e, possivelmente, porfiria cutanea tardia, síndromes semelhantes a Sjögren e outras condições autoimunes. Os mecanismos responsáveis pela persistência da infecção pelo HCV não foram ainda totalmente elucidados. A existência de *quasiespecies* e a grande capacidade mutagênica do vírus propiciam o constante escape à intensa resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro (Lingala 2015). Os efeitos da infecção pelo HCV nos seres humanos variam de hepatite subclínica à aguda e crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Lingala 2015).

A infecção persistente ocorre em 60-80% dos casos e entre esses, cerca de 20% dos casos, progridem ao longo de muitos anos, para cirrose ativa. Aqueles que são co-infectados pelo HIV, tem maior chance de progredir para cirrose e morte do que os demais infectados (Rich e Taylor, 2010; Lingala, 2015). Os pacientes com cirrose hepática tem um risco de aproximadamente 5% por ano de desenvolver carcinoma hepatocelular (ICTV, 2017). A infecção persistente pelo HCV tem sido epidemiologicamente ligada ao câncer de fígado primário, cirrose criptogênica e algumas formas de hepatite autoimune (ICTV, 2017).

O período médio de incubação do vírus varia de 6 a 8 semanas. Alguns fatores como apresentar genótipo 1, obesidade, raça negra, idade avançada, consumo de álcool e acúmulo de ferro no fígado estão associados a maior cronicidade da infecção. Geralmente os sintomas aparecem após os picos séricos das aminotransferases, que ocorre entre 6 a 12 semanas após a exposição ao HCV e esta duração corresponde ao surgimento dos sintomas que pode durar de 2 a 12 semanas. Nesta fase, que é caracterizada a fase aguda, equivale à presença de sinais clínicos, alterações enzimáticas ou sintomas (icterícia, fadiga, anorexia, náusea e outros sintomas inespecíficos) que pode durar até um período de 6 meses após o a exposição ao HCV (Blackard *et al*. 2008; Lingala, 2015) (Figura 7).

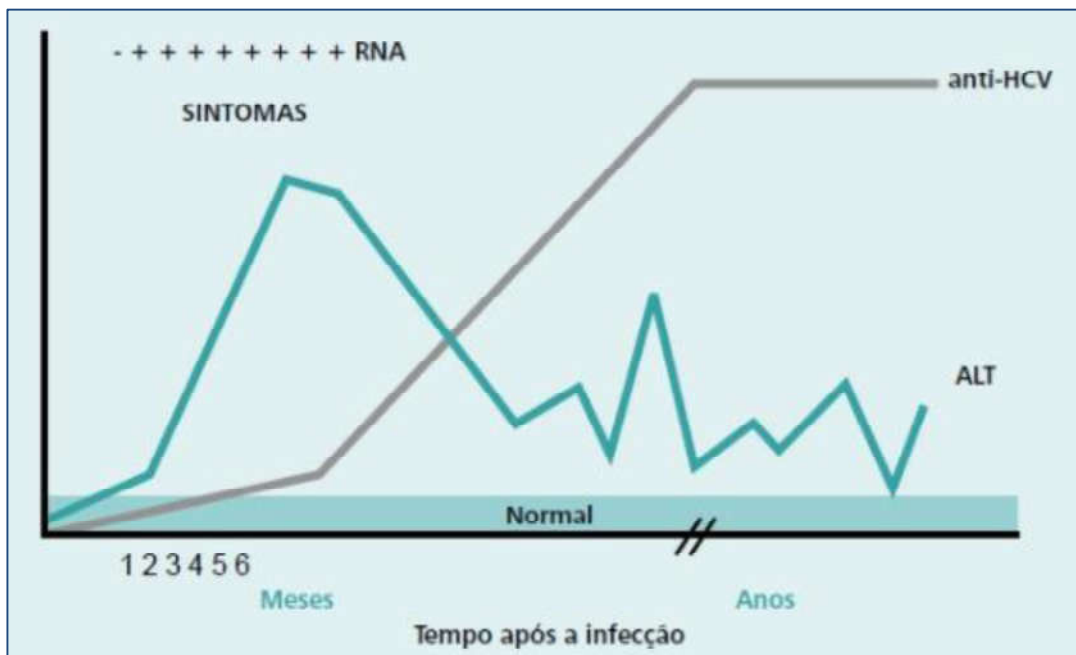


Figura 7. Curso clínico da infecção pelo HCV. O período de incubação é a fase entre a exposição ao vírus e o início dos sintomas. Ocorre em média após sete semanas a exposição, podendo variar entre duas a doze semanas. Neste período a pesquisa de anticorpos anti-HCV é negativa (janela imunológica), mas já é possível a detecção do HCV RNA. O HCV RNA é detectado precocemente, uma a duas semanas após a exposição. Muitas vezes assiste-se a um padrão flutuante das transaminases, que raramente ultrapassam as 200 UI/L, com períodos prolongados de valores normais. Assim, uma simples determinação de transaminases não permite excluir doença hepática progressiva, sendo necessário o seguimento prolongado destes pacientes para determinar a sua evolução (FONTE imagem: <http://prevencaodst.blogspot.com.br/2012/11/hepatite-c.html>).

A infecção crônica, além de evoluir lentamente, em anos ou décadas, costuma apresentar um amplo espectro clínico, desde formas assintomáticas com níveis de enzimas normais até a hepatite crônica intensamente ativa, cirrose e hepatocarcinoma (Lingala 2015).

Nos últimos anos, diferentes pesquisas têm evidenciado que as lesões hepáticas se relacionam a mecanismos imunomediados. (Lingala 2015). Os anticorpos específicos do vírus para proteínas estruturais recombinantes (C, E1 e E2) e proteínas não estruturais (principalmente NS3, NS4 e NS5) foram detectados em indivíduos infectados com HCV. Acredita-se que os epítomos lineares e conformacionais estejam envolvidos na resposta imune humoral do hospedeiro a infecção. A diversidade antigênica significativa ao longo do genoma

reflete-se na heterogeneidade da resposta imune humoral. No HCV, a grande variabilidade é encontrada na posição N-terminal do 27aa de E2 (região hipervariável 1, HVR1). O HVR1 contém um epítipo de neutralização do HCV e as variantes de escape de HVR1 são positivamente selecionadas pela resposta imune humoral do hospedeiro (Mondelli *et al*, 2003). Outros epítopos de neutralização foram identificados em E2, fora da HVR1, em E2 e em E1 (Fafi-Kremer *et al*, 2012, Edwards *et al*, 2012, Keck *et al*, 2004). As respostas imunes mediadas por células a todas as proteínas do HCV foram detectadas. Acredita-se que tais respostas estão associadas à melhora ou resolução da infecção (Klenerman e Thimme, 2012).

Semelhante a muitas infecções virais, as respostas imunes inata e adaptativas são essenciais no controle da infecção por HCV. As reações imunes inatas no fígado estão ligadas a células natural killers (NK), células NKT, células dendríticas, células de Kupffer e uma resposta de IFN rápida mediada por hepatócitos infectados. As células NK e NKT liberam granzimas e perforinas nas células infectadas. Além disso, essas células produzem enormes quantidades de IFN do tipo II (representado pelo IFN- γ) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Abdelwahab, 2016).

O ciclo de replicação do HCV conduz à montagem de intermediários de RNA de cadeia dupla (dsRNA) que podem desencadear a expressão de genes de IFN de tipo I. A este respeito, as células hospedeiras identificam dsRNA através dos receptores de reconhecimento de padrões conhecidos como Toll-like receptor 3 (TLR-3) (Abdelwahab, 2016). O reconhecimento do dsRNA pelo TLR-3 leva à ativação do fator 3 de regulação do interferon (IRF-3). IRF-3 induz a expressão de IFN- β e genes estimulados por interferon (ISGs). Os IFNs agem contra a replicação do HCV em células hospedeiras e protegem as células adjacentes não infectadas da infecção pelo HCV, induzindo a expressão de ISGs. A este respeito, o papel do TLR-3 em infecções virais foi mostrado em ratos *knock-out* que não conseguiram montar uma resposta à infecção pelo vírus do sarampo (Abdelwahab, 2016). Além disso, demonstrou-se que o TLR-3 leva a respostas imunes inatas contra a infecção pelo HCV (Abdelwahab, 2016).

Após a infecção aguda por HCV, 15-50% das pessoas infectadas atingem a cura de sua infecção espontaneamente (Abdelwahab, 2016). Vários estudos sugerem que a depuração viral bem sucedida depende da coordenação de

múltiplos braços do sistema imunológico. As respostas imunes inata e adaptativa desempenham um papel essencial neste processo. Respostas imunes adaptativas vigorosas e amplas foram identificadas em indivíduos agudamente infectados e essas respostas resistem entre aqueles que eliminam o vírus. Em contraste, a infecção persistente se correlaciona com respostas de células T fracas, muitas vezes imperceptíveis (Abdelwahab, 2016)

A resposta imune adaptativa inclui dois principais tipos de mecanismos efetores: respostas celulares que compreendem células auxiliares CD4 T (Th) e linfócitos T CD8 citotóxicos (CTL) e respostas humorais consistindo de anticorpos produzidos por células B específicas para o HCV. O reconhecimento de um epítipo/proteína viral específico é necessário para os mecanismos efetores imunes adaptativos, que podem direcionar qualquer proteína do HCV. No entanto, apenas alguns epítopos de células B localizados no envelope viral ou proteínas de capsídeo podem induzir anticorpos neutralizantes ao HCV e prevenir de forma eficiente a ligação e a entrada do vírus. As células dendríticas ativadas podem apresentar antígenos de HCV para as células Th específicas que respondem pela proliferação e produção de citocinas, tais como interleucina: IL-2, IFN- γ ou IL-4. A ativação de célula Th e a produção de citocinas são necessárias para o desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos (CTL). Idealmente, os CTL estimulados encontrados no fígado irão lisar células hepáticas infectadas com HCV por mecanismos citolíticos e não citolíticos (Abdelwahab, 2016).

Importantes linhas de pesquisa na busca de elucidação patogênica da hepatite C tem sido o estudo das interações entre proteínas virais do HCV e do hospedeiro. As proteínas do HCV orquestram uma rede de interação complexa e dinâmica com proteínas celulares que contribuem para a persistência viral e para a proteção do patógeno. Já foi observado que a proteína do *core* do HCV teria o sinal mais potente para iniciar as alterações celulares (Hui-Chun *et al*, 2014).

Através do ensaio de rastreamento de dois híbridos baseada em computação, foi construída uma rede de interação de vírus e proteína humana (Hui-Chun *et al*, 2014). As proteínas celulares relacionadas a quatro vias são principais alvos das proteínas do HCV: insulina, Jak / STAT, TGF- β e proteínas de vias de adesão. A proteína do *core* apareceu como um importante perturbador da rede IJT (via insulina, Jak / STAT e TGF- β). Foram encontradas setenta e seis proteínas celulares que interagem com a proteína do *core*. Ao interagir com

PLSCR1(fosfolipídeo scramblase 1), conectando insulina e JAK / STAT, a proteína do core pode, portanto, interferir tanto na insulina quanto nas vias JAK / STAT. Esta rede sugere que a proteína do core pode (1) interferir a resposta imune inata do hospedeiro através da interação com SLC25A5 (adenine nucleotide translocator 2 (fibroblast) [solute carrier family 25 member 5]; (2) induzir o estresse oxidativo através da interação com NDUFS2 [NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2] e ETFB (electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide); (3) afetar a via de adesão através de SLC25A5 e ENO1 (alpha enolase); e (4) elevar o nível de ferro hepático através de FTL (gene da cadeia leve da L-Ferritina) (Hui-Chun *et al*, 2014). Portanto, a proteína do core poderia potencialmente direcionar as vias de insulina, Jak / STAT, TGF- β e de adesão (Hui-Chun *et al*, 2014).

A progressão da lesão hepática na hepatite crônica para cirrose, pode ainda relacionar-se a fatores do hospedeiro, como: sexo, idade, uso de álcool ou co-infecção com outros vírus. O mais importante dos fatores do hospedeiro, entretanto, parece ser o seu estado imunológico. Assim, uma resposta imunológica vigorosa pode eliminar o HCV em 15% dos indivíduos que entram em contato com ele, enquanto que em pacientes crônicos, ou imunossuprimidos a doença evolui mais rapidamente para cirrose e hepatocarcinoma quando comparada aos imunocompetentes. Fatores hormonais e genéticos também estão implicados na patogênese da hepatite C, sendo aceito que a doença costuma progredir mais rapidamente no sexo masculino, com pior prognóstico naqueles com idade superior a 40 anos e RI > 2.

1.7 Epidemiologia

As hepatites virais constituem um enorme desafio à saúde pública em todo o mundo. Elas são responsáveis por cerca de 1,4 milhões de óbitos anualmente, como consequência de suas formas agudas graves ou, principalmente, pelas complicações das formas descompensadas crônicas ou por hepatocarcinoma (MS, 2017). Em todo mundo, estima-se que 150 - 170 milhões de indivíduos estão infectados pelo vírus da hepatite C, cerca de 3% da população mundial, e em

risco de desenvolver cirrose hepática e/ou câncer de fígado. Além disso, a incidência é de 3-4 milhões de infecções anualmente (WHO, 2016).

A hepatite C é uma doença de notificação compulsória desde 1996. Entre 1999 a 2016, foram detectados 182.389 casos dessa afecção, observando-se uma elevação da taxa de detecção em diferentes regiões (MS, 2017). De 1999 a 2016, foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) 561.058 casos confirmados de hepatites virais no Brasil. Destes, 182.389 (32,5%) são casos de hepatite C (MS, 2017). Na análise da distribuição dos casos com anti-HCV e HCV-RNA reagentes (155.032) por regiões, 64,1% ocorreram no Sudeste, 24,5% no Sul, 5,5% no Nordeste, 3,3% no Centro-Oeste e 2,5% no Norte (MS, 2017). Quanto à provável fonte ou mecanismo de infecção, é importante ressaltar que houve falta de informação em 52,1% de casos notificados, tornando difícil a caracterização das formas prevalentes. Entre os casos em que esse dado foi preenchido, foi observado que a maior fonte provável foi relacionada ao uso de drogas (29,2%), seguida de transfusão sanguínea (25,3%) e da relação sexual desprotegida (18,3%) (MS, 2017). Em 2016, o percentual de infecções relacionadas ao uso de drogas foi de 24,8%, e a proporção de infecções por via sexual foi maior que por via transfusional: 24,2% e 21,7%, respectivamente (MS, 2017).

Embora o HCV tenha distribuição mundial, existe um elevado grau de variação geográfica em sua prevalência. A prevalência da hepatite C é baixa (<1% anti-HCV) no Reino Unido, Escandinávia (0,01% a 0,1%), Américas, Europa Ocidental, Austrália e África do Sul (0,2% a 0,5%). Prevalências intermediárias (1,2 a 4% anti-HCV) são encontradas no Leste Europeu, Mediterrâneo, Oriente Médio e Índia. Outros países com prevalência intermediária incluem Brasil (1,3% anti-HCV), Europa Oriental, partes da África e Ásia (Perz *et al*, 2004; MS, 2017). Os países e regiões com as taxas mais altas (>4% anti-HCV) de infecção crônica são: Egito (22%), Paquistão (4,8%), China (3,2%) África Oriental e Central, Ásia Central, Rússia e Japão (EASL, 2015; Ansaldi *et al*, 2014), sendo o principal modo de transmissão nesses países atribuído às injeções usando seringas contaminadas (Wasley & Alter 2000; Yen *et al*. 2003; WHO 2012, Lavanchy, 2011; Lanini *et al*, 2016). Na América Latina existem cerca de 7 a 9 milhões de pessoas com HCV (Roman *et al*, 2014; Ximenes *et al*, 2015).

Em países desenvolvidos, as principais vias de transmissão são exposição ao sangue e derivados contaminados e o uso de drogas injetáveis que representam 40 a 50% dos casos. Já nos países em desenvolvimento as principais vias de infecção são os procedimentos médicos, como: cirurgias, hemodiálises e transfusão de sangue e derivados, resultando em cerca de 157.000-315.000 infecções pelo HCV ao ano, devido à falta de políticas públicas seguras destes procedimentos nestes países (Lavanchy, 2009; Lanini *et al*, 2016).

1.8 Transmissão e Prevenção

A hepatite C é transmitida principalmente pela via parenteral através de exposição da mucosa a sangue ou fluidos derivados do soro ou materiais perfurocortantes (seringas, alicates) contaminado com o HCV (Gupta *et al*, 2014). Alguns grupos apresentam maior vulnerabilidade para aquisição do vírus, tais como indivíduos que receberam transfusão de sangue, hemodialisados e usuários de drogas intravenosas que compartilham seringas (Tseng *et al*, 2016; Rerambiah *et al*, 2014; Marinaki *et al*, 2015). O uso de drogas intravenosas (DIV) é uma das principais formas de transmissão do HCV nos últimos 40 anos em países como os Estados Unidos e a Austrália, e atualmente este é o principal fator de risco em países desenvolvidos (Alter 2002; Dore *et al*, 2003; Chan *et al*, 2016). Nesses países, o uso de DIV responde por cerca de 70% a 80% das contaminações pelo HCV ocorridas nos últimos 30 anos (Alter 2002; Dore *et al*, 2003; Chan *et al*, 2016).

Outras formas de infecção pelo HCV incluem os procedimentos médicos e exposição nosocomial, transplante de órgãos, exposição ocupacional, transmissão vertical e sexual (Chan *et al*, 2016). Ao longo das duas últimas décadas, práticas efetivas de redução de casos contribuíram para a minimização da transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV), reduzindo simultaneamente a exposição ao HCV. No entanto, a infecção por HCV em homens não pertencentes à classe de usuários de drogas intravenosas, que fazem sexo com homens (MSM) tem sido cada vez mais relatada na literatura, um padrão que destaca a importância da transmissão sexual na disseminação epidemiológica do HCV (Chan *et al*, 2016).

Procedimentos com equipamentos ou seringas contaminadas se apresentam como uma forma possível de transmissão. Estima-se que aproximadamente 2 milhões de indivíduos se infectem por esta via. Em países subdesenvolvidos, muitas vezes ocorre à reutilização de material ou ausência de esterilização. Além disso, muitas terapias são realizadas em ambiente doméstico por indivíduos não habilitados, o que aumenta significativamente o risco de infecção pelo HCV (Hauri *et al*, 2004; Chan *et al*, 2016).

Acredita-se que entre os anos de 1960 e 1991, antes da introdução dos testes sorológicos nos bancos de sangue, 5% a 15% dos receptores de hemoderivados infectaram-se com HCV e, atualmente, após a adoção dos testes de rastreamento, o risco de infecção por transfusão sanguínea está em torno de 0,001% por unidade de sangue transfundida. A prevalência do anti-HCV em doadores de órgãos, varia de 4,2% a 5,1% dependendo do teste realizado. Receptores de órgãos sólidos de doadores anti-HCV positivos apresentam elevadas taxas de soroconversão. Em estudo realizado com transplantados renais, 35% dos receptores de doadores com anti-HCV reagente desenvolveram doença hepática no pós-transplante, e 74% apresentaram evidências de viremia. Apesar desses dados, as evidências ainda são limitadas e são necessários novos estudos para avaliar o impacto do transplante de órgãos na prevalência do HCV (Martins *et al*, 2011).

Quanto aos acidentes ocupacionais, os acidentes perfurocortantes são uma forma bem documentada de transmissão do HCV, apresenta taxas de soroconversão após uma única exposição percutânea com objeto sabidamente contaminado variando entre 3% e 10% (Mitsui *et al*, 1992; Lahphear *et al*, 1994, Martins *et al*, 2011). A transmissão vertical apresenta taxas variando entre 0% a 20%, com média em torno de 5% na maioria dos estudos (Taler *et al*, 1991; Martins *et al*, 2011).

A prevenção é realizada evitando, acima de tudo, o contato com sangue contaminado. Alguns dos cuidados são: não partilhar escovas de dente, lâminas, tesouras ou outros objetos de uso pessoal, nem seringas e outros instrumentos usados na preparação e consumo de drogas injetáveis e inaláveis, materiais hospitalares sempre descartáveis (transmissão nosocomial) e uso de preservativos nas relações sexuais.

1.9 Diagnóstico

1.9.1 Diagnóstico Sorológico

O diagnóstico da infecção pelo HCV é realizado através de testes de detecção de anticorpos, antígenos e do genoma viral em amostras de soro ou plasma. Para a detecção de anticorpos anti-HCV no plasma ou soro são utilizados ensaios imunoenzimáticos de terceira geração que detectam anticorpos contra vários epítomos do HCV e apresentam especificidade maior que 99% (Villar *et al*, 2015; Firdaus *et al*, 2015; Cloherty *et al*, 2016). Um dos problemas desta técnica é a possibilidade de resultados falsos negativos devido ao período de janela imunológica necessária para o surgimento de anticorpos. Além disso, indivíduos imunocomprometidos têm uma maior possibilidade de obterem resultados falsos negativos (Villar *et al*, 2015; Firdaus *et al*, 2015; Cloherty *et al*, 2016).

Os primeiros testes, denominados de testes de primeira geração (ELISA I), foram liberados para o uso comercial em 1990 e caracterizam-se pelo emprego de apenas uma proteína não-estrutural, o polipeptídio c100-3 (NS4), como antígeno alvo. A utilidade clínica era limitada, pois apresentava um tempo médio de soroconversão de até 16 semanas (Firdaus *et al*, 2015; Cloherty *et al*, 2016).

Em 1992, surgiu, nos Estados Unidos, os testes de segunda geração (ELISA II), com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade do método, e ainda diminuir o tempo necessário para a detecção dos anticorpos após a infecção (Alter *et al*, 1992). Nos testes de segunda geração, além de empregar o polipeptídio c100-3 correspondente a região NS4, houve a incorporação de outras proteínas recombinantes das regiões core (c-22-3) e NS3 (c-33-c), reduzindo o tempo de soroconversão de 16 para 10 semanas (Firdaus *et al*, 2015; Cloherty *et al*, 2016). Os testes de terceira geração (ELISA III), além dos antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos, incluiu-se o antígeno correspondente à região NS5 permitindo uma redução do tempo de detecção para sete semanas, e apresentando sensibilidade e especificidade de até 99% em indivíduos imunocompetentes infectados pelo HCV (Cossart 1999; Chevaliez *et al*, 2007).

Já estão disponíveis os testes de quarta geração para detecção simultânea de antígenos do HCV e anticorpos anti-HCV em amostras de soro ou plasma (Lambert 2007). O teste apresenta eficiência comparada à detecção qualitativa do

vírus e tem sido muito utilizado para acompanhamento de pacientes, onde permitem correlacionar os níveis de antígeno core com a carga viral no soro dos pacientes infectados podendo ser utilizado com marcadores de replicação do HCV (Buti *et al*, 2004). Além disso, testes utilizando a detecção do antígeno do core do HCV (p22) (HCVcAg) estão disponíveis e podem ser empregados no período de janela imunológica (Easterbrook *et al*, 2017).

Além do diagnóstico sorológico convencional, atualmente os testes rápidos para detecção de anticorpos anti-HCV vem sendo introduzidos como uma ferramenta alternativa e prática para o diagnóstico da hepatite C. O teste baseia-se no princípio da reação antígeno-anticorpo onde o antígeno encontra-se fixado na linha T do teste e os anticorpos anti-HCV na amostra do paciente (em casos de infecção por HCV). A linha T dos testes apresenta uma combinação de antígenos (core, NS3, NS4 e NS5) que pode variar de acordo com o fabricante (Scalioni *et al*, 2014; Portaria nº 730, de 2 de julho de 2013). Após a adição da amostra do paciente, na presença de anticorpos anti-HCV, este reage com o conjugado (proteína A) e migra até a linha T do teste onde se liga aos antígenos lá fixados produzindo cor rosa. Alguns estudos realizados até o momento encontraram resultados de sensibilidade e especificidade superiores a 95% (Scalioni *et al*, 2014). Além da praticidade do teste rápido, alguns ainda podem ser utilizados em amostras de fluido oral apresentando sensibilidade e especificidade, em ambientes de campo e laboratorial, superior a 90% (Scalioni *et al*, 2014).

A detecção de anti-HCV em fluídos alternativos como saliva e sangue seco em papel de filtro utilizando Elisa também já foi observado (Cruz *et al*, 2012; Brandão *et al*, 2013; Scalioni *et al*, 2014; Flores *et al*, 2017).

1.9.2 Diagnóstico Molecular

Para a detecção do HCV-RNA, testes qualitativos e quantitativos podem ser empregados em amostras de soro ou plasma. Estes testes são baseados na amplificação do DNA, através de métodos de biologia molecular, de regiões específicas do genoma do vírus como NS5B e 5'NC.

Os testes qualitativos permitem determinar a presença do HCV na fase inicial da infecção (1-2 semanas após exposição), antes mesmo da produção de anticorpos (Ozaras & Tahan 2009). São exemplos de testes qualitativos a reação

em cadeia de polimerase (PCR) ou testes de amplificação mediada pela transcrição (TMA). Ambos ensaios utilizam o produto da transcrição reversa (RT) (Chevaliez & Pawlotsky 2006). Alguns ensaios comerciais qualitativos incluem Cobas Amplicor HCV versão 2.0, com um limite de detecção de 50 UI/mL para todos os genótipos do HCV (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, Estados Unidos) e Versant HCV RNA ensaio qualitativo, com sensibilidade analítica de 10 IU/ml para os genótipos de 1 a 5 e 5,3 UI/ L para o genótipo 1 (Firdaus, 2015, Villar et al 2015).

Os testes quantitativos incluem a RT-PCR competitiva, PCR-ELISA quantitativa e PCR em tempo real. Estes testes devem apresentar elevada sensibilidade para determinação da carga viral antes e durante o tratamento antiviral, uma vez que são utilizados tanto no diagnóstico quanto no monitoramento da eficácia terapêutica (Strauss 2001; Portaria n° 221, de 13 de julho de 2011, Brasil). Os ensaios quantitativos disponíveis comercialmente são: técnica de branched DNA (bDNA) (Versant HCV RNA) (limite de detecção = 615 UI/mL), PCR em tempo real COBAS TaqMan/Cobas AmpliPrep (limite de detecção = 43 UI/mL – automatizado), Real Time HCV Abbott (limite de detecção = 10 UI/mL – automatizado), Cobas Amplicore Monitor HCV v.2 (limite de detecção = 600 UI/mL – semi-automatizado) (Villar *et al*, 2015).

Os métodos para a genotipagem do HCV são realizados através da análise de sequência direta, por PCR em tempo real, RFLP e tecnologia de hibridização reversa. O sequenciamento de Sanger é o padrão ouro para determinar os genótipos e subtipos do HCV. A técnica de sequenciamento consiste na amplificação por PCR de uma parte do genoma viral, em especial as regiões: 5'NC, NS5B e regiões do core com comparação destas sequências com as sequencias de genótipos previamente conhecidas (Scott, 2007). Além da determinação do genótipo, o sequenciamento também é usado para estudos de epidemiologia molecular e mutações de resistência às drogas de ação direta (DAAs) (Peres-da-Silva, 2015).

1.10 Tratamento

O objetivo da terapia é curar a infecção pelo HCV, a fim de prevenir as complicações das doenças hepáticas e extra-hepáticas relacionadas ao HCV,

incluindo necroinflamação hepática, fibrose, cirrose, HCC, manifestações extra-hepáticas severas e a morte. O ponto final da terapia é uma SVR, definido pelo HCV RNA indetectável no sangue 12 semanas (SVR12) ou 24 semanas (SVR24) após o fim da terapia, avaliado por um método molecular sensível com um limite de detecção inferior a ≤ 15 UI / ml (EASL 2016). Ambas as SVR12 e SVR24 foram aceitas como pontos finais da terapia por órgãos reguladores nos EUA e na Europa, dado que sua concordância é $> 99\%$ (Martinot-Peignoux *et al*, 2010).

Estudos de acompanhamento em longo prazo mostraram que a SVR corresponde a uma cura definitiva da infecção por HCV em mais de 99% dos casos (Swain *et al*, 2010). O antígeno do core do HCV não detectável 12 ou 24 semanas após o término da terapia pode ser usado como uma alternativa ao teste de HCV RNA para avaliar a SVR12 ou a SVR24, respectivamente, em pacientes com antígeno do core detectável antes do tratamento (Chevaliez *et al*, 2014, 2016; Freiman *et al*, 2016; Aghemo *et al*, 2016).

A determinação do genótipo do HCV, incluindo o subtipo 1a e 1b deve ser avaliado antes do início do tratamento. A genotipagem/subtipagem deve ser realizada em ensaio que discrimine com precisão o subtipo 1a do subtipo 1b, ou seja, deve ser realizado ensaio utilizando a região 5'NC e outra região genômica como o core ou NS5B (Chevaliez *et al*, 2009).

Quanto aos testes de resistência do HCV aos medicamentos aprovados, não há testes comerciais disponíveis. O teste de resistência depende do local e as técnicas são baseadas em estudos populacionais utilizando sequenciamento de Sanger ou nova geração (Fourati *et al*, 2015). Na Europa e em outros continentes, um número limitado de laboratórios disponibiliza. O desempenho dos ensaios *in house* variam amplamente. Dessa forma, os testes de resistência permanecem restritos a pesquisa e sem um consenso sobre a técnica ou interpretação, logo não é recomendado (Pawlotsky *et al*, 2016).

O tratamento da infecção crônica pelo HCV no Brasil consistia na administração da combinação de interferon peguilado alfa-2a ou alfa-2b (IFN) e ribavirina (Fried *et al*, 2002). O interferon peguilado e a ribavirina eram utilizados para o tratamento em pacientes monoinfectados com HCV e em pacientes co-infectados HCV/HIV. A resposta virológica sustentada era determinada pela ausência de RNA viral no período de seis meses após o tratamento (Pawlotsky 2009). A duração do tratamento para indivíduos monoinfectados HCV era

baseado no genótipo infectante onde, era recomendado 24 a 48 semanas de tratamento para os genótipos 2 ou 3 e 48 a 72 semanas para os genótipos 1 e 4. A taxa de resposta depende do genótipo infectante, o que sugere que as diferenças de seqüência entre genótipos influenciam a susceptibilidade a esses medicamentos (Van den Eynde *et al.* 2009; Portaria n° 221, de 13 de julho de 2011, Brasil). O tratamento é eficaz em aproximadamente 80% dos doentes infectados com o genótipo 2 ou 3 e menos de 50% dos doentes com o genótipo 1 (Pawlotsky 2009). Assim, doentes com o genótipo 1 necessitam de uma maior dose de RBV e tratamento mais prolongado (1,0-1,2 g/dia, 48 a 72 semanas) do que doentes infectados com o genótipo 2 ou 3 (0,8 g/dia, 24 a 48 semanas). Para os genótipos 4, 5 e 6 existem ainda poucos ensaios clínicos, aplicando-se o protocolo terapêutico utilizado para o genótipo 1 (Pawlotsky 2009; Portaria n° 221, de 13 de julho de 2011, Brasil).

Atualmente no Brasil, de acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções, do Ministério da Saúde (Portaria SVS/MS n° 221 de julho de 2015 - PCDT), para pacientes que não responderam aos esquemas anteriores, assim como para os que irão iniciar o tratamento pela primeira vez, são indicados pelo SUS os fármacos que são chamados de drogas de ação direta (Direct-Acting Antiviral - DAAs). O arsenal terapêutico do SUS para o tratamento da hepatite C crônica dispõe dos seguintes fármacos: daclatasvir (inibidor do complexo enzimático NS5A); simeprevir (inibidor de protease); e sofosbuvir (análogo de nucleotídeo que inibe a polimerase do HCV). Também está disponível no SUS a associação dos fármacos ombitasvir (inibidor de NS5A), dasabuvir (inibidor não nucleosídico da polimerase NS5B), veruprevir (inibidor de protease NS3/4A) e ritonavir (potencializador farmacocinético) – 3D (PCDT, 2017). Todos os medicamentos elencados atuam diretamente no HCV, interrompendo a sua replicação, e constituem avanços recentes no tratamento da hepatite C crônica (AASLD; IDSA, 2016, EASL, 2017).

De acordo com o Ministério da Saúde, indivíduos infectados pelo genótipo 1, recomenda-se o tratamento por 12 semanas com sofosbuvir e simeprevir ou sofosbuvir e daclatasvir. Indivíduos infectados pelo genótipo 2 devem usar sofosbuvir e ribavirina por 12 semanas, indivíduos infectados pelo genótipo 3 devem ser tratados com sofosbuvir, PEG-IFN e ribavirina ou daclatasvir por 12 semanas. Para o genótipo 4 é indicado o uso de daclatasvir e PEG-IFN +

ribavirina por 24 semanas, ou sofosbuvir + daclatasvir por 12 semanas. A ribavirina tem sido associada a clínica dos pacientes cirróticos.

Uma das principais barreiras para adoção dessa terapia é a falta de financiamento e os altos preços dos novos medicamentos. Os preços iniciais dos DAAs em países de alta renda foram extremamente elevados e continuaram a permanecer altos em muitos países. Por exemplo, o sofosbuvir, que foi introduzido no final de 2013, custou US\$ 1000 por comprimido nos EUA e sofosbuvir / ledipasvir em US\$ 1125 por comprimido. Isso desencadeou a atenção do Congresso dos EUA que investigou o preço do sofosbuvir (United States Senate, Government Publishing Office; 2015).

Os preços elevados e o financiamento limitado podem forçar os países a racionar ou apenas gradualmente aprimorar o tratamento do HCV. Por exemplo, no Brasil, pessoas sem fibrose ou fibrose leve não são elegíveis para tratamento. A Suíça inicialmente racionou o acesso ao tratamento, excluindo pacientes com danos hepáticos leves ou inexistentes devido a altos preços e acesso expandido somente depois que o país negociou pequenas reduções de preços de empresas originárias (Strauman et al 2016). Nos EUA, os pacientes da Califórnia e do Estado de Washington apresentaram ações judiciais contra uma companhia de seguros privada por restringir o acesso ao tratamento contra o HCV (Walker 2015; Silverman 2016).

Até o momento não existe uma vacina disponível contra a hepatite C. Porém, existem duas abordagens principais para o desenvolvimento de vacinas contra o HCV. Um é profilático e outro são vacinas terapêuticas para uso clínico. Nenhuma das abordagens atingiu a fase III de testes (Naderi *et al*, 2014). Desta forma, a prevenção primária contra a infecção pelo HCV está relacionada a eliminação dos comportamentos de risco para que as taxas de incidência da infecção sejam reduzidas e, conseqüentemente, diminuição dos casos de doença hepática (OMS, 2015).

Ao longo dos últimos anos, muitos estudos de associação ampla de genomas (Genoma Wide Associations Studies - GWAS) foram realizados com sucesso em uma variedade de áreas, dos quais cerca de 2% se relacionaram com a hepatologia. Essa ferramenta é útil para avaliar a possível associação entre a variação genética ao longo do do genoma humano e o fenótipo de interesse (Karlsen *et al*, 2010). Diversos estudos utilizando essa metodologia identificaram

polimorfismos de base única (Single Nucleotide Polymorphism - SNP) relacionados à menor resposta a terapia dupla e tripla e também a maior gravidade da lesão hepática (Falleti *et al*, 2012; Lange *et al*, 2011). Substituições de aminoácidos (aa) nas posições 70 e/ou 91 na região do core de HCV em pacientes infectados com genótipo 1b e com altas cargas virais também foram fatores preditivos de resposta virológica ineficiente a terapia antiviral (Akuta *et al*, 2005, 2007, 2010 e 2012), assim como, variações na sequência da região NS5A, denominada de ISDR (Região Determinante de Sensibilidade ao IFN), também relacionadas com a não resposta ao tratamento duplo (Enomoto *et al*, 1995 e 1996). Mutações específicas em diferentes posições do genoma viral têm sido associadas com diminuição da atividade antiviral aos novos agentes DAAs.

1.11 Metabolismo do fígado

O fígado é a maior víscera do corpo humano e desempenha grande número de funções vitais à saúde do organismo. A compreensão da fisiologia hepática é fundamental para a análise dos processos patológicos que acometem o órgão. O fígado é essencial na regulação do metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios, no armazenamento de substâncias e na degradação e excreção de hormônios. Além disso, tem como principal função digestiva a secreção da bile, exerce papel indispensável na filtração e armazenamento de sangue, degradando xenobióticos (compostos estranhos ao organismo, por exemplo, medicamentos e drogas tóxicas). O fígado também é responsável pelo armazenamento das vitaminas D, A e B12 (por 4, 10 e 12 meses, respectivamente) e ferro (ligado à proteína ferritina) e atuam na síntese das proteínas plasmáticas e fatores da coagulação (Ferramosca *et al*, 2017).

1.12 Sistema hormonal da vitamina D

Os seres humanos obtêm a vitamina D a partir da exposição solar, da dieta e de suplementos alimentares. Mais de 90% da vitamina D sistêmica provém da pele e cerca de 10% da ingestão de alimentos. Existem duas formas principais de vitamina D: vitamina D3 (Colecalciferol) e vitamina D2 (Ergocalciferol) (Holick *et al*, 2004).

As principais fontes alimentares de vitamina D são os produtos de origem animal, particularmente os peixes como salmão, sardinhas, cavala, arenque, óleo de fígado de bacalhau, atum e tubarão. A produção da vitamina D pela pele é determinada pelo comprimento de onda (290 – 315 nm) da luz solar, latitude, estação do ano e grau de pigmentação da pele. A radiação UVB incide sobre o 7-deidrocolesterol (7-DHC) na pele e este é subsequentemente hidrolisado no fígado e rins para as forma 25-hidroxi-vitamina D [25(OH)] e 1,25-diidroxi-vitamina D [1,25(OH)₂D], respectivamente (Adams *et al*, 1982, Holick *et al*, 2004) (Figura 8).

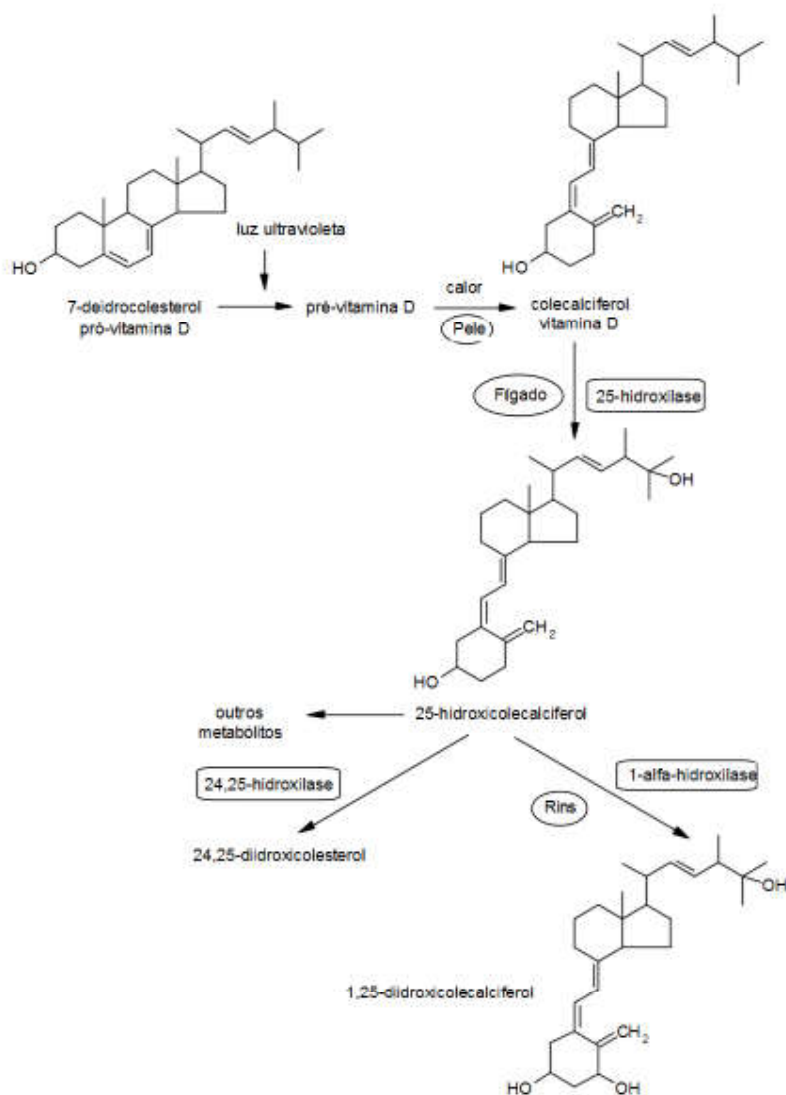


Figura 6. Síntese da forma hormonal 1,25-diidroxivitamina D. Após ação de raios UVB sobre o 7-deidrocolesterol, esse isomeriza-se em colecalciferol na pele. Em seguida é transportado até o fígado, onde sofre ação da enzima 25-hidroxilase convertendo-a em 25-hidroxitamina D [25(OH)D]. Nos rins sofre nova hidroxilação e é convertida nas formas 24,25-diidroxivitamina D (inativa) ou 1,25-diidroxivitamina D (ativa). Adaptado de Premaor *et al*, 2006.

A vitamina D é um nutriente essencial para manutenção da saúde. É membro da superfamília de hormônios esteróides nuclear e foi descoberta pela primeira vez em estudos de prevenção do raquitismo em crianças (Misra *et al*, 2008). Pesquisas posteriores descobriram que a vitamina D tem funções

fisiológicas bastante amplas. Atualmente, os efeitos biológicos da vitamina D são divididos em duas categorias: i) clássica: no metabolismo de cálcio e fósforo; ii) não clássica: relacionada principalmente a função imune, inflamação, antioxidação, antifibrose e outros (Handono *et al*, 2014; Reddy *et al*, 2013). Além dos efeitos inibitórios sobre muitos tipos de malignidades (Reddy *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2014).

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é um hormônio autocrino. A enzima 1α -hidroxilase também é amplamente expressa em células não-renais, tais como osteoblastos, monócitos, macrófagos, células neuronais, células pancreáticas, e células cancerosas como no câncer de mama e cólon (Henry *et al*, 2013; Hossein-Nezhad *et al*, 2013). Além de múltiplas funções, a vitamina D possui múltiplos órgãos alvos. O receptor nuclear de vitamina D (VDR) após ativação pode influenciar a expressão de muitos genes. O VDR é amplamente expresso no rim, células do sistema imune e outras células (Cantorna *et al*, 2004). Estudos demonstraram que os níveis e atividade da vitamina D estão intimamente relacionados com a ocorrência e desenvolvimento de muitas condições crônicas, tais como doenças malignas, autoimunes, distúrbios metabólicos e doenças infecciosas (Ahmed *et al*, 2015). Uma vez formada, a vitamina D_3 é excretada para fora da membrana plasmática e é atraída para a proteína transportadora de vitamina D [vitamin D Binding Protein (DBP)]. Já a vitamina D ingerida é incorporada a quilomicrons que são absorvidos no sistema linfático (Mathieu *et al*, 2005; Holick, 2007) e transferidas para o sangue venoso onde ligam-se a DBP e lipoproteínas e são transportadas para o fígado (Holick, 2007, Hossein-Nezhad *et al*, 2012). Essas proteínas de transporte são filtradas nos rins e reabsorvidas nos túbulos proximais (Holick 2007,2012). Na circulação encontramos principalmente a $25(\text{OH})\text{D}$ complexada a sua proteína de transporte DBP [$25(\text{OH})\text{D}$ -DBP] (Kim *et al*, 2012). Em estudos realizados com ratos knockout para o gene que codifica DBP, a DBP mostrou caráter protetor da degradação renal das formas $25(\text{OH})\text{D}$ e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Safadi *et al*, 1999), para fins de ajuste dos níveis sistêmicos de vitamina D (Taes *et al*, 2006). Além disso, a susceptibilidade a uma variedade de tumores malignos, incluindo câncer de mama, câncer de próstata, câncer colorretal, também é relacionado à redução de VDBP (Weinstein *et al*, 2015). Alguns desses estudos ainda encontraram relação com síntese e secreção de insulina (Johnson *et al*, 1994; Dunlop *et al*, 2005).

1.13 Receptor da Vitamina D (VDR)

O VDR foi descrito em 1974, em mucosa intestinal de modelos animais, por Brumbaugh e Hausslere, e pertence à família dos receptores de hormônios esteroides /tireóideos (Brumbaugh & Hausslere 1974). Trata-se de um receptor intracelular cuja proteína é composta por três regiões distintas: i) um domínio N-terminal DNA-ligante com dois dedos de zinco; ii) um domínio ativo C-terminal ligante; iii) uma região extensa e não estruturada que liga os dois domínios funcionais da proteína (região dobradiça). A região C-terminal é a mais complexa e possui doze cadeias α -hélices. Dessa forma, esses domínios do VDR modelam uma molécula receptiva aos níveis fisiológicos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, capaz de ativar a maquinaria de regulação de grupos de genes que produzem proteínas necessárias aos efeitos desse hormônio (Pike & Meyer, 2010).

O mecanismo de ação do VDR é baseado no reconhecimento de uma sequência de DNA específica, chamada de elemento responsivo a vitamina D. Esse sítio de ligação existe em diversos genes e permite o acoplamento do VDR após sua heterodimerização com receptor X do ácido retinóico (RXR) (Mangelsdorf & Evans, 1995; Haussler *et al*, 1998) o que irá ativar ou desativar a transcrição dos genes de interesse (Figura 9) (Sergeev & Rhoten 1995).

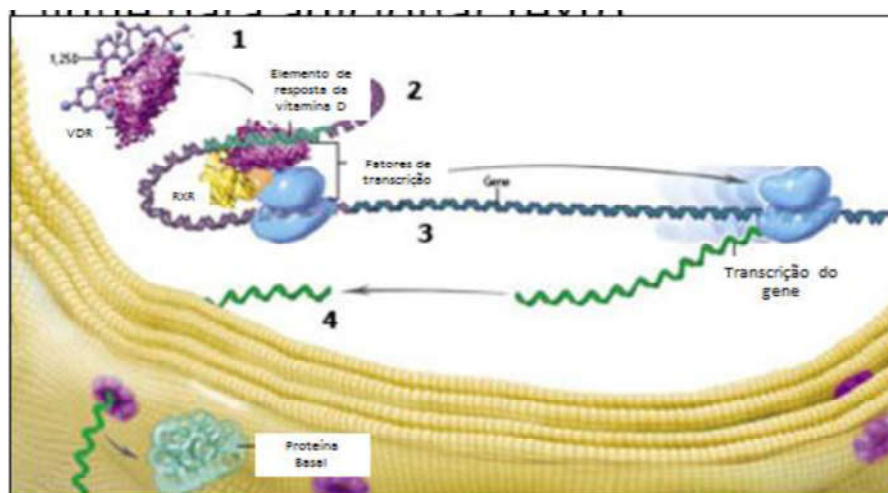


Figura 9. Mecanismo de ativação do receptor de vitamina D (VDR). 1. No interior do núcleo da célula, a molécula de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se liga a uma proteína chamada receptor de vitamina D (VDR). 2. A VDR forma um complexo com uma proteína semelhante, o receptor do retinóide-x (RXR), e juntas elas se ligam a uma região na fita de DNA denominada elemento de reação da vitamina D. 3. Ligado ao elemento de resposta, o VDR-RXR recruta as proteínas do fator de transcrição para o complexo, levando à transcrição do gene mais próximo. 4. A transcrição do gene deixa o núcleo para ser traduzida pelo mecanismo celular no citoplasma para uma proteína acabada. Fonte: ANDREW SWIFT

O gene que codifica o VDR (ID:7421) é composto por 11 éxons que, somados aos íntrons do gene se expandem por aproximadamente 75Kb e está localizado no cromossomo 12q13.11 (Miyamoto *et al*, 1997). De acordo com o *gene bank*, o VDR possui mais de 900 SNPs incluindo as regiões codificantes e não codificantes do genoma. Na literatura, a maioria dos trabalhos que se propuseram a estudar SNPs do VDR avaliaram os polimorfismos FokI (rs2228570), BsmI (rs1544410), ApaI (rs7975232) e TaqI (rs731236) (Figura 8).

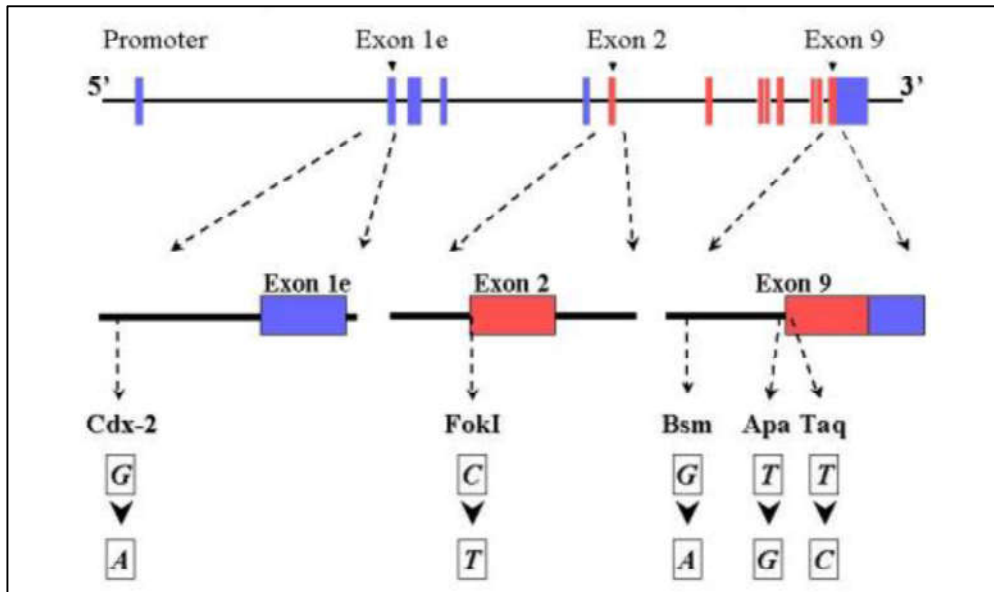


Figura 8. Representação esquemática do VDR e seus principais polimorfismos. Fonte: www.genomos.eu/history.

1.14 Vitamina D vs. Hepatite C crônica

Dentre as vitaminas armazenadas no fígado está a vitamina D, cuja forma hormonal ativada é o 1,25 dehidroxivitamina D, sendo essencial para a homeostase do osso e cálcio (Holick *et al*, 2004; Mosekilde *et al*, 2005), assim como também pode estar envolvida na resposta imune e câncer (Prosser & Jones, 2004). Esta vitamina também já foi encontrada em baixos níveis séricos em pacientes com hepatite crônica e cirrose de diferentes origens (Monegal *et al*, 1997; Tsuneoka *et al*, 1996; Bouillon *et al*, 1984). Baixos níveis de 25 (OH) vitamina D foram relacionados à disfunção hepática devido à associação entre a concentração sérica da vitamina D e os índices de função hepática (Monegal *et al*,

1997) ou estágio de fibrose hepática (Monegal *et al*, 1997; Masuda *et al*, 1989; Hofmann *et al*, 2008).

A vitamina D é um importante imunomodulador e desempenha um papel importante em doenças metabólicas e inflamatórias no fígado, incluindo a infecção pelos vírus das hepatites C. A deficiência de vitamina D é comum nas populações saudáveis em todo o mundo (Rosen *et al*, 2011). Apesar disso, os pacientes com doenças do fígado, como a hepatite crônica C estão em risco substancialmente mais elevado para a hipovitaminose D (Bitetto *et al*, 2011; Petta *et al*, 2010; Melo-Villar *et al*, 2013).

O polimorfismo do gene VDR foi associado com a susceptibilidade à infecção pelo HBV e ao curso clínico desta infecção em populações africanas, asiáticas e do Oriente Médio (Arababadi *et al*, 2010; Suneetha *et al*, 2006), enquanto que na hepatite C, este polimorfismo foi associado com a progressão rápida para fibrose (haplotipo bAt[CCA]) (Baur *et al*, 2012). Estas informações juntas demonstram o potencial da associação do eixo VDR-vitamina D nas hepatites virais e ressalta a importância da vitamina D como imunomodulador, indicando associação entre a deficiência de vitamina D e a ausência de RVS em pacientes com hepatite C (Lange *et al*, 2011; Ladero *et al*, 2013).

Foram descritos polimorfismos do gene VDR [BsmI (rs1544410), ApaI (rs7975232), TaqI (rs731236), GC (rs7041 e rs4588)] relacionados com a progressão da fibrose e cirrose em pacientes com hepatite C (Baur *et al*, 2012) e com uma eliminação viral não efetiva em pacientes com hepatite B (Arababadi *et al*, 2010). Contudo, nenhum estudo descreveu polimorfismos destes genes em pacientes brasileiros infectados pelo HCV. No Brasil, a taxa de miscigenação é elevada e os hábitos alimentares são muito diferentes do padrão europeu e oriental (Baur *et al*, 2012; Falletti *et al*, 2012), fatores estes que, podem influenciar consideravelmente os resultados em nossa população.

Além disso, estudos demonstraram que variantes genéticas do receptor da vitamina D (VDR) em pacientes com hepatite C sob tratamento com peg-interferon/ribavirina, foi observado que o haplotipo bAt [CCA] foi significativamente associado com a ausência de resposta ao tratamento antiviral. Também foi observado que o genótipo CC em ApaI (rs7975232) semelhante ao haplotipo supracitado também está relacionado a não resposta ao tratamento antiviral com interferon e ribavirina independentemente do genótipo do gene IL-28B (Lange *et*

al, 2011; Baur *et al*, 2012). Em estudo realizado por Lange e colaboradores foi observado que o gene CYP27B1-1260 responsável pela regulação da 1-alfa-hidroxilase foi associada à hepatite C crônica. De acordo com o estudo, os indivíduos que apresentaram genótipo AA apresentaram maior concentração de vitamina D do que os pacientes com o genótipo AC e CC. Além disso, foi observado que a RVS foi maior em pacientes com genótipo AA ou CA (Lange *et al*, 2012). Falletti e colaboradores observaram que variantes genéticas no gene GC, responsável por codificar a proteína de transporte da vitamina D, está associado à baixa concentração de Vitamina D e a predição da RVS. Estes estudos também são amparados por trabalhos realizados *in vitro* que verificaram a ação antiviral da vitamina D (Faletti *et al*, 2012; Gal-Tanamy *et al*, 2011; Matsumura *et al*, 2012).

Conforme os trabalhos já descritos, estudos genéticos encontraram relação entre a concentração de vitamina D e a diminuição da resposta ao tratamento antiviral (interferon/ribavirina) em pacientes com hepatite C portadores do genótipo 1, 2 e 3 em terapia dupla com peg-interferon e ribavirina (Petta *et al*, 2010; Lange *et al*, 2011). Bitetto e colaboradores observaram que a concentração de vitamina D e o polimorfismo na rs12979860 do gene IL28B foram fatores preditivos independentes da resposta ao tratamento. Pacientes que não apresentaram o genótipo CC (IL28B) e com deficiência de vitamina D apresentaram maior risco de não responderem ao tratamento antiviral. A concentração de vitamina D foi complementar para predizer a falha no tratamento (interferon/ribavirina) (Bitetto *et al*, 2011).

Outros estudos demonstraram que a concentração de vitamina D em pacientes portadores de HCV é menor do que entre indivíduos saudáveis e que pacientes com hepatite C respondedores ao tratamento apresentam níveis significativamente mais elevados de vitamina D em relação aos não-respondedores (Bitetto *et al*, 2011; Petta *et al*, 2010; Mohamed *et al*, 2013). Da mesma forma, estudo realizado em 166 pacientes afros americanos infectados com HCV demonstrou que os pacientes que apresentaram insuficiência ou deficiência de vitamina D apresentaram progressão da inflamação hepática duas vezes maior que os demais pacientes (White *et al*, 2013).

A suplementação da terapia antiviral com vitamina D (>32 ng/mL) também foi realizada em estudo de Nimer e colaboradores (2012) onde 95% destes

pacientes com genótipo 2 e 3 em tratamento com ribavirina e peg-interferon apresentaram negatização da carga viral nas semanas 4 e 12. Foi observada também, deficiência de vitamina D em pacientes coinfectados HIV/HCV, na qual indivíduos com baixa concentração apresentaram menor resposta ao tratamento antiviral para hepatite C (Mandorfer *et al*, 2013). Weintraub e colaboradores (2012) observaram maior taxa de resposta virológica sustentada (RVS) em pacientes americanos portadores de HCV do genótipo 1 com maiores concentrações de 25(OH) Vitamina D. Estudos realizados *in vitro* demonstraram que a vitamina D age diretamente como um agente antiviral ao inibir a replicação do HCV em linhagens humanas de células de hepatoma (Gal-Tanamy *et al*, 2011) e que a concentração de 25(OH) vitamina D foi inversamente proporcional à concentração do core e do HCV RNA em cultura (Matsumura *et al*, 2012). Adicionalmente, algumas citocinas (IL-6, IL-17, IL-23) foram correlacionadas negativamente com a concentração da vitamina D em pacientes com hepatopatias, tendo em vista que altos níveis destas citocinas foram associados com baixa concentração da vitamina D (El Hussein *et al*, 2012; Hammad *et al*, 2013).

O Egito tem a maior taxa de prevalência de infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) em todo o mundo, onde a hepatite C é considerado um grande problema de saúde. O tratamento padrão do HCV é a terapia combinada de interferon peguilado e ribavirina. A resposta (RVS) só é alcançada em 30% dos pacientes. Devido, principalmente aos efeitos adversos e custo do tratamento, a descontinuação do tratamento tem sido uma importante abordagem. Dessa forma, Abdelsalam *et al* (2017), avaliou a associação entre a concentração de vitamina D e os polimorfismos do receptor de vitamina D (VDR) com a aquisição da RVS, onde a concentração de vitamina D, e os polimorfismos FokI e TaqI foram considerados como preditores para a resposta antiviral com a combinação de interferon peguilado e ribavirina (Abdelsalam *et al*, 2017).

Atualmente, estudos tem sido realizados relacionando os níveis de vitamina D e a RVS em tratamento com antivirais de ação direta (DAA). Backsteadt *et al* (2017) avaliaram a associação de níveis de vitamina D com cirrose em uma coorte infectada por HCV, no período pré tratamento até a RVS da semana 12. Foi observado maior prevalência de deficiência de Vitamina D em coortes de pacientes HCV-cirróticos, porém a alteração nos níveis de vitamina D não

influenciaram nas taxas de RVS desses pacientes (Backsteadt *et al*, 2017). Belle *et al* (2017), avaliou em uma coorte francesa o impacto dos níveis de vitamina D em pacientes com genótipo 1, virgens de tratamento e submetidos a terapia dupla convencional (interferon + ribavirina). Nenhum impacto foi observado entre os níveis de vitamina D e a resposta à terapia antiviral dupla convencional (Belle *et al*, 2017). Estudos também avaliaram polimorfismos genéticos relacionados a cascata da vitamina D em uma população Tailandesa e observaram que polimorfismo no gene DHCR7 pode ser um marcador preditivo de resposta ao tratamento a terapia dupla (interferon+ribavirina) em paciente com HCV genótipo 1 (Thanapirom *et al*, 2017).

1.15 Ação da Insulina

A ação da insulina na célula inicia-se pela sua ligação ao receptor de membrana plasmática. Este receptor está presente em praticamente todos os tecidos dos mamíferos, mas suas concentrações variam desde 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 nas células adiposas e hepáticas. O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituída por 2 sub-unidades a e duas subunidades b, unidas por ligações dissulfeto (Kahn *et al*, 1985). A sub-unidade a é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A sub-unidade b é uma proteína transmembrana responsável pela transmissão do sinal e possui atividade tirosina quinase (Kasuga *et al*, 1982). O ATP age como doador de fosfatos e a fosforilação ocorre em resíduos tirosina. O mecanismo molecular exato da ação da insulina é desconhecido, mas parece depender da remoção do efeito inibitório da sub-unidade a sobre a atividade da sub-unidade b do seu receptor. A insulina induz a autofosforilação do receptor, aumentando a sua capacidade de fosforilar um ou mais substratos protéicos intracelulares. A fosforilação de seus substratos dá início a uma série de eventos incluindo a cascata de reações de fosforilação e defosforilação que regula os seus efeitos metabólicos e de crescimento (Sun *et al*, 1991; White *et al*, 1997).

1.16 Resistencia Insulinica e HCV

O metabolismo do fígado apresenta como principais hormônios a insulina e o glucagon, que atuam na manutenção dos níveis glicêmicos dentro dos limites saudáveis. A insulina diminui a quantidade de glicose produzida pelo fígado enquanto o glucagon aumenta a produção da mesma. A ingestão de alimentos aumenta o nível de glicose no sangue. Este aumento estimula a produção de insulina pelo pâncreas, diminuindo a produção de glicose pelo fígado. O fígado responde a qualquer excesso de glicose no sangue e converte esse excesso em glicogênio, uma fonte de energia que pode ser convertida de novo em glicose, quando necessário. A redução da produção de glicose pelo fígado e a conversão do excedente em glicogênio resulta na diminuição dos níveis de glicemia. Contudo, diversas situações fisiológicas (puberdade, gravidez, menopausa etc) e patológicas (obesidade, diabetes tipo2 – DM2, dislipidemias, esteatohepatite não alcoólica, infecções crônicas etc) podem levar à resistência à insulina, com caráter transitório ou definitivo (Manual sobre insulino-resistência, 2009).

A síndrome metabólica apresenta como principal característica a resistência à insulina (RI) que é caracterizada por hiperinsulinemia em pacientes com glicemia de jejum normal e tem sido associada com um risco aumentado de desenvolver diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e doença hepática gordurosa não alcoólica (Cannon, 2008). Fatores genéticos e adquiridos podem influenciar a sensibilidade à insulina. A síndrome de resistência a insulina e o diabetes tipo 2 são poligênicos e podem envolver polimorfismos em vários genes que codificam as proteínas envolvidas nas vias de sinalização, secreção e metabolismo intermediário da insulina (Taylor *et al*, 1990).

A infecção crônica pelo HCV está associada com resistência à insulina (RI) (Parvaiz *et al*, 2011), que é caracterizada por hiperinsulinemia em pacientes com glicemia de jejum normal e tem sido associada com um risco aumentado de desenvolver diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e doença hepática gordurosa não-alcoólica (Cannon, 2008; Abdel-Rahman *et al*, 2012). Estudos internacionais demonstram prevalência de resistencia insulinica de 16% a 44,12% em pacientes com hepatite C (Dai *et al*, 2012). Também foi observada alta incidência da RI e diabetes tipo 2 em pacientes com hepatite C, em comparação à outras doenças hepáticas (White *et al*, 2008), assim como foi observado que RI

na doença crônica associada ao HCV predispõe ao DM2 e diminui a resposta ao tratamento antiviral para os genótipos 1 (Romero-Gómez *et al*, 2005;2008;2011; Conjeevaram *et al*, 2007), genótipos 2 e 3 (Poustchi *et al*, 2008). Além disso, pacientes infectados pelo HCV que respondem à terapia antiviral demonstraram maior sensibilidade à insulina (Kawaguchi *et al*, 2007).

Estudos moleculares, epidemiológicos, observacionais e ensaios randomizados controlados, destacaram a interação entre a hepatite C e resistência à insulina (White *et al*, 2008; Younossi e McCullough, 2009; Serste *et al*, 2010). Os estudos moleculares demonstraram a capacidade do HCV de promover a resistência à insulina, interferindo com a sinalização intracelular da insulina. Camundongos transgênicos que expressam a proteína core do HCV desenvolveram esteatose (acúmulo de triglicerídeos e outros lipídios nas células hepáticas que ocorre em consequência de diversas desordens metabólicas), resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2. Em cultura de células, a transfecção com o replicon JFH-1 (Hepatite fulminante do Japão-1) promove a degradação do substrato 1 e 2 do receptor de insulina, que resulta em resistência à insulina (Romero-Gómez, 2011). Além disso, o uso do danoprevir, um inibidor de protease do HCV em monoterapia melhora o índice de resistência à insulina quando a carga viral diminui, apoiando o fato de que a replicação do HCV influencia na resistência a insulina (Moucari *et al*, 2010).

Apesar destas evidências, os mecanismos pelo qual o HCV promove a resistência à insulina não são completamente compreendidos e parecem ser genótipo-específicas e dependentes da ação das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , supressores de citocina 3, proteína tirosinofosfatase e receptor ativado de proliferação de peroxissomo- α e o alvo mamífero da rapamicina (Shitani *et al*, 2004; Douglas & George, 2009; Del-Campo *et al*, 2012). A variabilidade genética do HCV pode ter papel relevante no desenvolvimento da RI tal como descrito por Hsieh e colaboradores (2012) que observaram que a proteína E2 do HCV está envolvida na patogênese do DM2 por indução da RI em cultivo celular contendo o HCV. Do mesmo modo, Khaliq e colaboradores (2011) observaram que a variabilidade do gene core do HCV também pode ter papel relevante no desenvolvimento da RI em pacientes com HCV.

O HCV prejudica a β oxidação dos lipídeos mitocondriais, o que resulta em baixa combustão lipídica e na inibição da proteína trifuncional mitocondrial

pelo HCV, como observado em hepatócitos infectados pelo HCV. Além disso, uma abordagem de biologia de sistemas identificou a enzima de oxidação de ácido graxo mitocondrial, dodecenoil coenzima, como uma proteína de estrangulamento que controla a reprogramação metabólica do hospedeiro durante a infecção por HCV.

O HCV também mostrou impedir a exportação de lipídeos do fígado através da redução da atividade de proteína de transferência de triglicerídeos (MTTP) em estudos com animais (Chang *et al*, 2016). A infecção pelo HCV, principalmente através da atividade da proteína do core do HCV, diminui a expressão e atividade do receptor de proliferação de peroxissoma (PPAR) - α / γ em hepatócitos (Chang *et al*, 2016). A proteína do core do HCV localiza-se na membrana das vesículas lipídicas e induz a acumulação de gordura hepática ativando SREBP-1c (Figura 10). Uma interação *in vitro* entre a proteína do core do HCV e a apolipoproteína AII também foi relatada, sugerindo-se que a proteína do core do HCV interage diretamente com o receptor X retinoide α , um regulador transcricional que controla muitas funções celulares, incluindo o metabolismo lipídico (Chang *et al*, 2016). A proteína do core do HCV atua como um fator patogênico envolvido na acumulação de gotículas lipídicas, mudanças na expressão de genes lipogênicos e / ou atividade de proteínas lipogênicas de maneira específica para os genótipos (Chang *et al*, 2016).

As substituições de aminoácidos nas posições 182 e 186 do genótipo 3a (G3a) do HCV e no aminoácido 70 / Q do genótipo 1b (G1b) do HCV afetam o metabolismo lipídico e contribuem para o desenvolvimento de esteatose. A esteatose hepática é mais comum em pacientes infectados com HCV do genótipo 3 (G3), possivelmente devido aos efeitos diretos das proteínas do core do HCV G3. No entanto, a proteína do core pode não ser a única proteína viral envolvida na esteatose induzida por HCV. Uma interação entre NS5A e apolipoproteína AI foi observada *in vitro*. A expressão de NS5A de HCV em células de hepatoma humano aumentou a formação de gotículas lipídicas através de lipogênese melhorada e a expressão transcricional de coativador PPAR γ (PGC) 1 α e diacilglicerol aciltransferase-1, mas reduziu a expressão transcricional de MTTP e PPAR γ (Chang *et al*, 2016) (Figura 10).

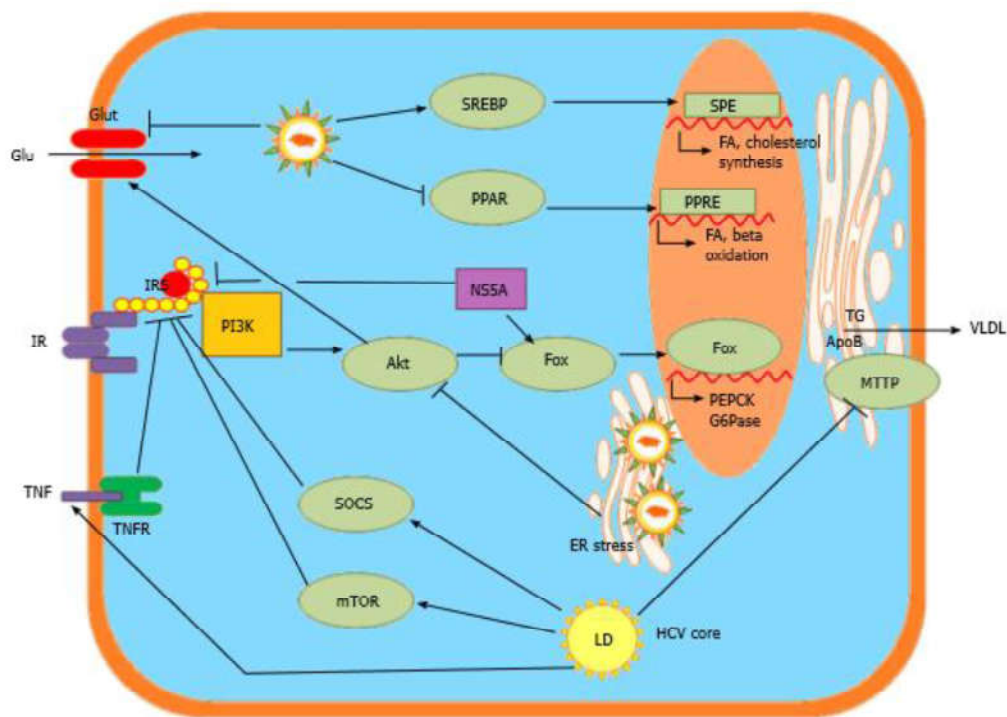


Figura 10. Alterações metabólicas associadas ao vírus da hepatite C no hepatócito. SREBP: proteínas reguladoras do elemento regulador de esterol; PPAR: receptores ativados por proliferadores de peroxisomas; Glu: Glicose; Glut: transportador de glicose; ER: retículo endoplasmático; SRE: elemento de resposta SREBP; FA: ácido graxo; PPRE: elemento de resposta PPAR; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; Akt: Protein kinase B; Fox: Fator de transcrição box forkhead; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinase; G6Pase: glicose 6 fosfatase; IR: receptor de insulina; IRS: substrato do receptor da insulina; NS5A: proteína não estrutural de HCV; TG: triglicerídeo; ApoB: Apolipoproteína B; MTTP: proteína de transferência de triglicerídeos microsossomal; VLDL: lipoproteína de colesterol de baixa densidade; SOCS: Supressor de proteínas de sinalização de citocinas; mTOR: alvo mamífero da rapamicina; TNF: fator de necrose tumoral; TNFR: receptor do factor de necrose tumoral; LD: gotícula lipídica. Fonte: Chang *et al*, 2016.

Uma das consequências da persistência da RI pode ser o desenvolvimento de diabetes tipo 2 levando ao aumento da produção de glicose pelo fígado e desenvolvimento de complicações endoteliais, doença renal ou hepática. A diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia que pode ocorrer devido a defeitos na secreção e/ou ação da insulina envolvendo processos patogênicos específicos, tais como a destruição das células beta do pâncreas produtoras de insulina ou resistência à ação da insulina. Esta é uma doença metabólica com alta prevalência entre os indivíduos com hepatite C em comparação com aqueles indivíduos infectados pelo vírus da hepatite B, por exemplo, (Fraser *et al*, 1996; Serfaty *et al*, 2009). A diabetes de tipo 2

compreende aproximadamente 90% dos casos e pode ter um componente genético e ambiental. Já a diabetes tipo 1, compreende cerca de 10% dos casos, e resulta na destruição de células beta, que pode acabar por conduzir à deficiência absoluta de insulina, necessitando assim a administração exógena da mesma para evitar a cetoacidose e coma.

2. JUSTIFICATIVA

Dentre as vitaminas armazenadas no fígado está a vitamina D, cuja forma hormonal ativada é o 1,25 dehidroxivitamina D, sendo essencial para a homeostase do osso e cálcio (Holick *et al*, 2004; Mosekilde *et al*, 2005), assim como também pode estar envolvida na resposta imune e câncer (Prosser & Jones, 2004). Esta vitamina também já foi encontrada em baixos níveis séricos em pacientes com hepatite crônica, onde a prevalência de hipovitaminose D varia de 14% a 92,4% em pacientes infectados pelo HCV (Farnick *et al*, 2013; Monegal *et al*, 1997; Tsuneoka *et al*, 1996; Bouillon *et al*, 1984). Baixos níveis de 25 (OH) vitamina D têm sido relacionados à disfunção hepática, devido à associação entre a concentração sérica da vitamina D e os índices de função hepática (Monegal *et al*, 1997) ou grau de fibrose hepática (Monegal *et al*, 1997; Masuda *et al*, 1989; Hofmann *et al*, 2008). Foi observada deficiência de vitamina D em pacientes coinfectados HIV/HCV, tendo os indivíduos com baixa concentração apresentado menor resposta ao tratamento antiviral para hepatite C (Mandorfer *et al*, 2013).

Estudos também demonstraram que variantes genéticas do VDR e no gene GC (codificador da proteína transportadora da vitamina D) em pacientes com hepatite C estão significativamente associadas com a ausência de resposta ao tratamento antiviral, porém nenhum estudo foi realizado na América do Sul, especialmente no Brasil que possui uma população amplamente miscigenada.

A hepatite C crônica assim como o diabetes mellitus são de grande importância clínica, devido as suas altas taxas de morbidades e mortalidade. Nos últimos anos, estudos moleculares, epidemiológicos, observacionais e ensaios randomizados controlados, destacaram principalmente a interação entre a hepatite C e resistência à insulina, demonstrando a importância de compreender melhor esta interação. A síndrome de resistência à insulina e o diabetes tipo 2 são poligênicos e podem envolver polimorfismos em vários genes que codificam as proteínas envolvidas nas vias de sinalização, secreção e metabolismo intermediário da insulina. Estudos internacionais demonstram prevalência de resistência insulínica entre 16% a 44,1% dos pacientes com hepatite C (Mehta *et al*, 2000; Dai *et al*, 2012). Também foi observada alta incidência da RI e diabetes tipo 2 em pacientes com hepatite C, em comparação à outras doenças hepáticas (White *et al*, 2008), assim como foi observado que a RI na doença crônica

associada ao HCV predispõe ao DM2 e diminui a resposta ao tratamento antiviral para os genótipos 1 (Romero-Gómez *et al*, 2005;2008;2011; Conjeevaram *et al*, 2007), genótipos 2 e 3 (Poustchi *et al*, 2008). Além disso, pacientes infectados pelo HCV que respondem à terapia antiviral demonstraram maior sensibilidade à insulina (Kawaguchi *et al*, 2007).

A variabilidade genética do HCV pode ter papel relevante no desenvolvimento da RI tal como descrito por Hsieh e colaboradores (2012) que observaram que a proteína E2 do HCV está envolvida na patogênese do DM2 por indução da RI em cultivo celular contendo o HCV. Do mesmo modo, Khaliq e colaboradores (2011) e Chang e colaboradores (2016) observaram que a variabilidade do gene core do HCV também pode ter papel relevante no desenvolvimento da RI em pacientes com HCV. Apesar destas evidências, os mecanismos pelo qual o HCV promove a resistência à insulina não são completamente compreendidos. Dessa forma, em uma época em que quase todos os paciente com HCV tem sucesso em seus tratamentos com DAAs, é importante determinar se as alterações metabólicas associadas ao vírus da hepatite C são completamente reversíveis ou se alguns são agravados após a depuração. Essas descobertas ajudarão a fornecer cuidados personalizados para pacientes com infecção crônica ou passada por HCV.

3. OBJETIVOS

Determinar os níveis séricos e polimorfismos genéticos associados com a vitamina D e resistência insulínica em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C, a fim de avaliar a influencia destes parâmetros no tratamento antiviral e compreender a patogênese da infecção pelo HCV.

3.1 Objetivos Específicos

- Determinar os níveis séricos de 25 OH vitamina D em pacientes infectados pelo HCV antes do tratamento antiviral, a fim de avaliar a relação entre os níveis deste parâmetro no soro e a resposta ao tratamento antiviral;
- Determinar os polimorfismos do gene receptor da vitamina D (VDR) Bsm1, Taq1, Apa1 e GC em pacientes infectados pelo HCV, a fim de verificar se existe alguma associação entre estes polimorfismos e taxa de resposta antiviral;
- Determinar a prevalência da resistência insulínica em pacientes infectados pelo HCV atendidos em Centros de referência de tratamento no Rio de Janeiro;
- Determinar a variabilidade genética do gene do core do HCV em pacientes com e sem RI, a fim de avaliar a influência destes genes na presença ou ausência de resistência insulínica.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta tese serão apresentados na forma de manuscritos, sendo três publicados e dois submetidos para publicação em revistas científicas indexadas na base de dados da Capes. Os artigos estão listados a seguir na ordem em que foram realizados e que serão discutidos:

4.1 Artigo 1 Melo-Villar L, Lampe E, de Almeida AJ, de P Scalioni L, Lewis-Ximenez LL, Miguel JC, Del Campo JA, Ranchal I, Villela-Nogueira CA, Romero-Gomez M. Hypovitaminosis D and its relation to demographic and laboratory data among hepatitis C patients. *Ann Hepatol.* 2015 Jul-Aug;14(4):457-63. PubMed PMID:26019031

Artigo 1.2 Villar LM, Lampe E, de Almeida AJ, de Paula Scalioni L, Lewis-Ximenez LL, Miguel JC, del Campo JA, Ranchal I, Villela-Nogueira CA, Romero-Gomez M. Reply to contribution on the topic of hypovitaminosis D in chronic hepatitis C. *Ann Hepatol.* 2016 Jan-Feb;15(1):139-40. PubMed PMID: 26626653.

4.2 Artigo 2 Scalioni LP, Santos BR, Spritzer PM, Villela-Nogueira CA, Lewis-Ximenez LL, Pollo-Flores P, Esberard EBC, Brandão-Mello CA, Lampe E, Villar LM. Impact of Vitamin D receptor and binding protein gene polymorphisms on clinical and laboratory data of HCV patients. Submetido a *Medicine*

4.3 Artigo 3 Villar LM, Caldas GC, Scalioni LP, Miguel JC, Silva EF, Marques VA, Villela-Nogueira CA, Lewis-Ximenez LL, Lampe E. High prevalence of insulin resistance among Brazilian chronic hepatitis C patients. Submetido a *Archives of Endocrinology and Metabolism* e aceite

4.4 Artigo 4 Scalioni LP, Peres-da-Silva A, Miguel JC, Espírito-Santo MP, Marques VA, Brandão-Mello CE, Villela-Nogueira CA, Lewis-Ximenez LL, Lampe E, Villar LM. Lack of Association between Hepatitis C Virus core Gene Variation 70/91aa and Insulin Resistance. *International Journal of Molecular Science.* Received: 31 March 2017; Accepted: 24 May 2017; Published: date

Artigo 1

Hypovitaminosis D and its relation to demographic and laboratory data among hepatitis C patients

Melo-Villar L, Lampe E, de Almeida AJ, de P Scalioni L, Lewis-Ximenez LL, Miguel JC, Del Campo JA, Ranchal I, Villela-Nogueira CA, Romero-Gomez M.

Situação de publicação: artigo publicado em Ann Hepatol. 2015 Jul-Aug;14(4):457-63. PubMed PMID:26019031

Qualis: B2

Objetivo do estudo: O objetivo deste estudo foi determinar a concentração de 25(OH)D em uma coorte de pacientes brasileiros com hepatite C crônica e investigar a relação entre a concentração de 25(OH)D e parâmetros laboratoriais e virológicos.

Hypovitaminosis D and its relation to demographic and laboratory data among hepatitis C patients

Livia Melo-Villar,* Elisabeth Lampe,* Adilson J. de Almeida,* Letícia de P. Scalioni,*
Lia L. Lewis-Ximenez,* Juliana C. Miguel,* José A. Del Campo,** Isidora Ranchal,**
Cristiane A. Villela-Nogueira,*** Manuel Romero-Gomez**

* Laboratory of Viral Hepatitis, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

** Unit for the Clinical Management of Digestive Diseases and CIBERehd, Hospital Universitario de Valme, Sevilla, Spain.

*** Hepatology Unit, Medical Clinic Department, Clementino Fraga Filho University Hospital, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil.

ABSTRACT

Background. The relationship between 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] serum levels and response to antiviral therapy and laboratory data in HCV infection remains unclear. The aim of this study was to determine pre-treatment 25(OH)D serum level among HCV infected individuals and to evaluate the association between vitamin D status, virological response, and laboratory data. **Material and methods.** Baseline serum 25(OH)D levels were measured in 237 chronic HCV infected patients (139 female, age 53.7 ± 11.2 years) using chemiluminescence immunoassay. Correlations between serum 25(OH)D levels, virological and laboratory data regarding HCV infection as well as sustained virological response (SVR) to antiviral therapy were evaluated. **Results.** Mean serum values of 25(OH)D was 26.2 ± 12 ng/mL and prevalence of vitamin D deficiency (< 30 ng/mL) was 66.2%. Advanced age (> 55 years), high mean values of LDL, total cholesterol, HDL and low mean values of alkaline phosphatase and hemoglobin were statistically associated to vitamin D deficiency. Antiviral treatment was underwent by 133 HCV patients and 44.3% of them achieved SVR. Most of individuals that presented SVR also presented 25(OH)D level higher than 30ng/mL (55.9%). SVR was associated to low mean values of LDL, total cholesterol and platelets; high mean values of ALT, AST and low fibrosis grade. **Conclusions:** In conclusion, low vitamin D levels were observed among HCV infected patients and was associated to laboratory findings, however baseline 25(OH)D level is not independently associated with SVR.

Key words. Vitamin D. Hepatitis C virus. Virological response. Treatment.

INTRODUCTION

Vitamin D, whose active form is 1,25-dihydroxy vitamin D₃, is essential for calcium and bone homeostasis, and its deficiency has been associated with a number of diseases, such as cancer, cardiovascular and autoimmune diseases, insulin resistance (IR), and infectious disease.¹⁻⁵ Among patients with chronic liver disease, vitamin D deficiency is often observed and that finding has been related to severe fibrosis, low responsiveness to interferon-based antiviral

therapy in genotype 1 chronic hepatitis C (CHC) and the presence of mixed cryoglobulinemia and systemic vasculitis among CHC patients.⁶⁻⁹

Hepatitis C virus (HCV) infection affects more than 130 million of individuals¹⁰ and its treatment is usually based in pegylated interferon (PEG-IFN) and ribavirin (RBV) for 24 weeks for patients infected with HCV genotypes 2 or 3, or 48 weeks for those infected with HCV genotype 1, with rates of sustained virological response (SVR) ranging from 60-70% among CHC patients with genotypes 2 and 3, but lower than 50% in patients with genotype 1 using conventional IFN therapy.¹¹ In order to increase SVR rates, the influence of genetic and metabolic factors have been studied, and, in the context, interleukin-28B (IL28B) polymorphism and IR are found to be associated to SVR.¹²⁻¹⁴ In addition, Nimer, *et al.*¹⁵ and Abou-Mouch, *et al.*¹⁶ have shown that vitamin D supplementation improves viral response in CHC patients infected with genotypes 1, 2 or 3.

Correspondence and reprint request: Livia Melo-Villar, Ph.D.
Viral Hepatitis Laboratory, Helio and Peggy Pereira Pavillion-Ground Floor-
Room B09, FIOCRUZ Av. Brasil, 4365-Manguinhos-Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Postal Code: 210360-040.
E-mail: lvillar@ioc.fiocruz.br

Manuscript received: October 01, 2014.
Manuscript accepted: December 01, 2014.

The aim of our study was to determine serum levels of 25(OH)D in a cohort of CHC patients from Brazil, and to investigate the potential relationships between 25(OH)D levels and laboratory and virological parameters.

MATERIAL AND METHODS

Patients

The study population included CHC patients, resident in Rio de Janeiro and recruited at Viral Hepatitis Ambulatory (Viral Hepatitis Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ), Hepatology Unit (Clementino Fraga Filho University Hospital, UFRJ), and General Medicine Department (Gaffrée Guinle University Hospital, UNIRIO). Patients were included if they had a virological diagnosis of CHC [anti-HCV and HCV RNA reactive serum sample, with persistently abnormal alanine aminotransferase (ALT), for at least 6 months]. The infecting HCV genotypes were the following: 1, 2, 3, and 5. Exclusion criteria were advanced cirrhosis (Child-Pugh B and C), presence of hepatocellular carcinoma, human immunodeficiency virus (HIV) and/or hepatitis B co-infection, autoimmune liver disease, genetic liver disease (Wilson's disease, hemochromatosis), previous HCV antiviral treatment, excessive alcohol consumption, concomitant use of drugs known to affect serum vitamin D concentration and intravenous drug use.

This study was conducted following the principles of the Declaration of Helsinki and their appendices. Approval was obtained from FIOCRUZ Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all subjects.

Clinical and laboratory assessment

Clinical and anthropometric data were collected simultaneously from all patients. Body mass index (BMI) was calculated on the basis of weight in kilograms and height (in meters). Waist circumference (cm) was measured at the midpoint between the lower border of the rib cage and the iliac crest. A 12-h overnight fasting blood sample was drawn to determine serum levels of ALT, gamma-glutamyltransferase (GGT), total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL), triglycerides, ferritin, plasma glucose concentration, and platelet count. Serum insulin was determined by a chemiluminescence immunoassay (LIASON Insulin assay, Diasorin, Italy).

IR was determined with the homeostasis model assessment method.¹⁷

The analysis of serum 25(OH) D was performed using a chemoluminescent immunoassay on a Liaison automatic analyzer (Liaison 25 OH Vitamin D, DiaSorin). Data were expressed as nanograms per milliliter. In accordance with the manufacturer's instructions, serum 25(OH)D concentration of 30 ng/mL was considered the threshold value for identifying low levels of vitamin D. Individuals were classified as vitamin D deficient when serum 25(OH)D concentration was below 30ng/mL.

All patients were tested for HCV RNA by qualitative polymerase chain reaction (Cobas Amplicor HCV Test version 2.0, Roche, Austria; limit of detection: 50 IU/mL). HCV RNA positive samples were quantified by COBAS TaqMan HCV Test (Roche) and expressed as IU/mL. HCV genotyping was performed with INNO-LIPA HCV II kit (Innogenetics, Zwijnaarden, Belgium), which were used according to the manufacturer's instructions or using genotype-specific primers for entire core region and a part of 5' noncoding region (5'NCR).¹⁸

Hepatic fibrosis was assessed using serum biochemical markers.¹⁹ Fib-4 index [age (years) x AST (IU/L)]/[platelet count (10⁹/L) x ALT (IU/L)1/2] and Forns index [7.811-3.131 X ln platelet count + 0.781 x ln GGT (IU/L) + 3.467 x ln age (years) - 0.014 x cholesterol (mg/dL)] were used. If FIB-4 was less than 1.45, individual was considered as low fibrosis and if FIB-4 was \geq 1.45, Forns was considered. Forns lower than 4.2 was classified as low fibrosis and Forns \geq 4.2 was classified as high fibrosis.

Statistical analysis

Continuous variables were summarized as mean (\pm SD) and categorical variables as frequency and percentage. Nonparametric tests such as Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to compare continuous variables that were not normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test). Continuous variables with normal distribution were compared by using unpaired Student *t*-test. χ^2 test was used for comparison of categorical variables.

Univariate regression analysis was performed using 25(OH)D serum levels as a categorical dependent variable, and as candidate independent factors related to low serum levels of 25(OH)D, we selected age, gender, BMI, baseline ALT, AST, platelet count, GGT, ferritin, total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides, alkaline phosphatase, hemoglobin,

blood glucose, insulin, homeostasis model assessment score, fibrosis, SVR, HCV genotype, HCV RNA levels. Univariate regression analysis was also done to identify predictors of SVR as a category dependent variable among HCV individuals who underwent antiviral therapy. Variables associated with the dependent variable in the univariate regression analyses (probability threshold, $P < 0.05$) were included in the multivariate logistic regression models. We used SPSS software, version 20.0 (IBM, USA) for all statistical analyses.

RESULTS

Patient characteristics

A total of 237 CHC patients were included in the study and the baseline features are shown in table 1. Mean age of HCV patients was 53.7 ± 11.2 years and most of them were female (58.6%). Mean BMI was 28.1 ± 3.8 kg/m² and 79.6% of them were in the overweight to obesity range.

HCV patients presented mean values of biochemical parameters (ALT, AST, GGT, alkaline phosphatase, ferritin) above normal values, while mean lipid values (HDL, LDL, triglycerides) were classified as normal values. Mean blood glucose values were considered elevated (104.9 ± 45.5 ng/mL) as well as mean HOMA score value (3.6 ± 3.7). Using HOMA score, IR was found among 59.9% of CHC patients. Mean hemoglobin values was 14.0 ± 1.3 ng/mL and 17 (7.1%) were classified as anemic (hemoglobin values < 12 ng/mL for women and < 13 ng/mL for men). HCV genotype 1 was the most prevalent (87%), and mean HCV RNA was considered high ($9.4 \pm 85.0 \times 10^6$ UI/mL). Using non invasive methods, most of individuals presented high fibrosis grade (70.04%).

Serum 25(OH)D levels

Mean serum values of 25(OH)D in CHC patients were 26.2 ± 12.0 ng/mL Table 1. One hundred and fifty seven (66.2%) patients had vitamin D deficiency (< 30 ng/mL). Table 2 shows the results of comparative analysis of demographic and clinical variables and serum vitamin D concentration, categorized according to previously defined cutoff values.

Age ($P = 0.003$), high total cholesterol ($P = 0.001$), high LDL cholesterol ($P = 0.023$), high HDL cholesterol ($P = 0.049$), low alkaline phosphatase ($P = 0.009$) and low hemoglobin levels ($P = 0.018$), were associated with lower 25(OH)D levels

Table 1. Baseline demographic, laboratory, metabolic and histological features of 237 chronic hepatitis C (CHC) patients.

Variable*	CHC patients* (n = 237)
Age, years	53.7 ± 11.2
Sex	
Male/Female (n)	98/139
Body mass index, kg/m ²	28.1 ± 3.8
Platelet count $\times 10^3$ /mm	185.3 ± 79.6
HCV RNA, $\times 10^6$ IU/mL	9.4 ± 85.0
ALT, IU/L	72.0 ± 56.3
AST, IU/L	76.4 ± 53.4
Phosphatase alkaline, IU/L	140.1 ± 102.4
γ -GT, IU/L	105.6 ± 116.0
Cholesterol, mg/dL	198.7 ± 125.8
HDL cholesterol, mg/dL	51.8 ± 17.9
LDL cholesterol, mg/dL	125.5 ± 125.2
Triglycerides, mg/dL	105.1 ± 54.4
Ferritin, ng/mL	210.5 ± 118.6
Blood glucose, ng/mL	104.9 ± 45.5
Insulin, μ U/mL	13.1 ± 11.8
Haemoglobin, ng/mL	14.0 ± 1.3
HOMA score	3.6 ± 3.7
HOMA index, n (%)	
< 2	95 (40.1%)**
≥ 2	142 (59.9%)**
Serum 25-Hydroxyvitamin D, n (%)	
< 30 ng/mL	157 (66.2%)**
≥ 30 ng/mL	80 (33.8%)**
HCV genotypes, n (%)	
1	206 (86.9%)**
Non 1	31 (13.1%)**
Hepatic fibrosis, n (%)	
Low	71 (29.9%)**
High	166 (70.1%)**

* Continuous variables are expressed as mean value \pm standard deviation.

** Percentages in parenthesis referred to the total of patients (n = 237).

ALT: alanine aminotransferase. AST: aspartate aminotransferase. γ -GT, gamma glutamyltransferase. HDL: high-density lipoprotein. LDL: low-density lipoprotein. HOMA: homeostatic model assessments.

in CHC at univariate regression analysis. At multivariate analysis, age ($P = 0.019$) and haemoglobin levels ($P = 0.017$) were found independent factors in multiple linear regression analysis (Table 2).

Mean values of blood glucose, GGT, AST and HCV RNA viral load were elevated among vitamin D deficiency individuals, though these variables were not statistically significant. Although vitamin D deficiency was common among anemic individuals (13/17), no statistical significance was observed ($p = 0.428$). Interestingly, most of individuals

presenting vitamin D deficiency also presented high fibrosis grade (71.4%) and IR (61.1%).

Factors associated with SVR

One hundred and thirty three HCV patients underwent and completed the antiviral treatment program. SVR was achieved in 59 individuals (44.2%) and all of them belonged to genotype 1. Low LDL ($P = 0.019$), low total cholesterol ($P = 0.004$), high AST ($P = 0.000$), high ALT ($P = 0.000$), low platelets ($P = 0.036$) and low fibrosis ($P = 0.011$) were

associated with SVR (Table 3) in the univariate analysis, but none of them were associated to SVR at multivariate analysis. SVR was more prevalent in those patients without IR (52.5%) presenting high 25(OH)D levels (55.9%). However, these variables were not statistically significant.

DISCUSSION

In the present study, serum 25(OH)D levels were evaluated in HCV infected patients according to antiviral therapy response and clinical-biochemical

Table 2. Univariate and multivariate regression analysis of factors associated with serum 25(OH)D levels in 237 chronic hepatitis C patients.

Variable*	25 (OH) Vitamin D levels		Bivariate analysis P Value	Multivariate analysis OR (95% CI)	P value
	< 30 ng/mL (n = 157)	≥ 30 ng/mL (n = 80)			
Age (years)	55.2 ±10.6	50.6 ±11.8	0.003	0.958 (0.929-0.987)	0.005
Sex			0.07		
Female	99	40			
Male	58	40			
Body mass index (kg/m ²)	28.1 ±3.8	28.3 ±4.1	0.896	NA	NA
Glucose (mg/dL)	108.2 ±50.7	99.1 ±33.7	0.494	NA	NA
LDL (mg/dL)	139.5 ±152.4	100.7 ±37.9	0.023	0.999 (0.980-1.020)	0.956
Triglycerides (mg/dL)	104.7 ±59.6	105.8 ±43.6	0.431	NA	NA
Total cholesterol (mg/dL)	214.5 ±151.3	169.5 ±40.9	0.001	0.992 (0.973 - 1.011)	0.41
HDL (mg/dL)	53.6 ±19.2	48.6 ±14.9	0.049	0.995 (0.969 - 1.022)	0.716
Insulin (mU/mL)	13.7 ±12.4	12.2 ±10.9	0.577	NA	NA
GGT (IU/L)	110.2 ±125.0	96.6 ±96.3	0.62	NA	NA
AST (IU/L)	80.2±56.7	69.1 ±45.8	0.062	NA	NA
ALT (IU/L)	69.3 ±55.9	77.3 ±56.9	0.206	NA	NA
Alkaline phosphatase (IU/L)	134.2 ±109.1	151.8 ±87.7	0.009	1.001 (0.998-1.004)	0.386
Hemoglobin (ng/mL)	13.9 ±1.3	14.3 ±1.3	0.018	1.328 (1.053-1.675)	0.017
Platelets (10 ³ /mm)	186.7 ±76.1	182.8 ±86.1	0.739	NA	NA
Ferritin (ng/dL)	210.0 ±115.9	214.0 ±144.9	0.926	NA	NA
HCV RNA (IU/mL)	1.2 × 10 ⁷ ± 1.0 × 10 ⁸	1.6 × 10 ⁶ ± 2.7 × 10 ⁶	0.289	NA	NA
Sustained virological response, [§] n			0.6	NA	NA
Yes	26	33			
No	37	37			
Fibrosis, n				NA	NA
Low	45	26	0.638		
High	112	54			
HOMA, n			0.35	NA	NA
< 2	61	34			
≥ 2	96	46			
HCV genotype, n			0.134	NA	NA
1	141	65			
Non 1	16	15			

* Continuous variables data are expressed as mean value ± standard deviation. NA: not available. Values in bold indicate significant values ($p < 0.05$). ALT: alanine aminotransferase. AST: aspartate aminotransferase. γ -GT, gamma glutamyltransferase. HDL: high-density lipoprotein. LDL: low-density lipoprotein. HOMA: homeostatic model assessments.

Table 3. Univariate and multivariate regression analysis of risk factors associated with sustained virological response (SVR) in 133 chronic hepatitis C patients.

Variable*	No sustained viral response (n = 74)	Sustained viral response (n = 59)	Bivariate analysis P Value	Multivariate analysis OR (95% CI)	P value
Age (years)	53.0 ± 12.8	52.0 ± 10.0	0.638	NA	NA
Glucose (mg/dL)	98.4 ± 36.2	108.1 ± 46.7	0.223	NA	NA
LDL (mg/dL)	110.5 ± 37.2	95.4 ± 35.8	0.019	0.995 (0.971-1.020)	0.705
Triglycerides (mg/dL)	112.4 ± 50.9	103.3 ± 35.5	0.534	NA	NA
Total cholesterol (mg/dL)	181.7 ± 41.1	163.1 ± 35.5	0.004	1.014 (0.991-1.038)	0.226
HDL (mg/dL)	50.2 ± 13.1	48.1 ± 12.6	0.432	NA	NA
Insulin (µU/mL)	13.4 ± 12.6	12.4 ± 14.5	0.268	NA	NA
GGT (IU/L)	103.4 ± 150.9	96.9 ± 94.3	0.932	NA	NA
AST (IU/L)	58.4 ± 43.3	98.8 ± 60.2	0.000	0.995 (0.981-1.009)	0.465
ALT (IU/L)	67.6 ± 48.6	102.8 ± 66.2	0.000	0.993 (0.981-1.005)	0.249
Alkaline phosphatase(IU/L)	187.5 ± 118.1	168.64 ± 80.6	0.655	NA	NA
Hemoglobin(ng/mL)	14.3 ± 1.5	13.9 ± 1.3	0.129	NA	NA
Platelets (10 ³ /mm)	178.3 ± 80.2	149.1 ± 74.6	0.036	0.997 (0.991-1.004)	0.464
HCV RNA (IU/mL)	2.9 × 10 ⁷ ± 1.6 × 10 ⁸	7.7 × 10 ⁵ ± 1.0 × 10 ⁶	0.066	NA	NA
Vitamin D, n ^s			0.600	NA	NA
< 30 ng/mL	37	26			
≥ 30 ng/mL	37	33			
Fibrosis, n ^s			0.011	2.157 (0.6675-6.895)	0.195
Low	29	10			
High	45	49			
HOMA, n ^s			0.061	NA	NA
< 2	30	31			
≥ 2	44	28			
HCV genotype, n ^s			0.982	NA	NA
1	71	59			
Non 1	03	00			

* Continuous variables data are expressed as mean value ± standard deviation. [§] Total values were not 237 individuals, since only 133 underwent antiviral treatment. NA: not available. Values in bold indicate significant values (p < 0.05). ALT: alanine aminotransferase. AST: aspartate aminotransferase. γ-GT: gamma glutamyltransferase. HDL: high-density lipoprotein. LDL: low-density lipoprotein. HOMA: homeostatic model assessments.

features of HCV infection. To our knowledge, this is the first study that describes vitamin D levels among HCV infected individuals from South America giving some new insight about this parameter in tropical regions. The major findings of this study were:

- High prevalence of hypovitaminosis D in HCV infected patients.
- The association between low serum 25OHD levels and some demographic (age) and laboratory data (LDL, cholesterol, HDL, alkaline phosphatase, hemoglobin).
- Lack of association between serum 25OHD levels and SVR to IFN-based therapy.

High prevalence of hypovitaminosis D (66.3%) was observed in Brazilian HCV infected individuals

similar to that observed among European and American HCV patients. Prevalence of hypovitaminosis D varying from 46.4 to 73% among mono-infected HCV patients from Italy^{1,14,21} and 86% among HIV-HCV infected individuals from France.⁹ A recent metanalysis also showed that 71% of HCV infected individuals from Europe and North America had low vitamin D levels.²² In the present study, low serum 25OHD levels was associated to higher values of mean age, LDL, total cholesterol, HDL, and low mean values of alkaline phosphatase, hemoglobin in the univariate regression analysis, although only age was statistically significant in the multivariate analysis. Petta, *et al.*¹ have also demonstrated that age and HDL cholesterol are independently associated to low vitamin D levels, however the reason for this finding it is not explained.

This study also demonstrated that low vitamin D levels were not associated to fibrosis grade as observed by Kitson, *et al.*²³ and Bitetto *et al.*¹⁴ among HCV infected individuals from Australia and France, respectively. The differences observed in these studies could be due to different reasons:

- Absence of data regarding the season when blood sampling was performed; during the summer individuals could be more exposed to sun and consequently they could present higher levels of vitamin D²⁴.
- High frequency of high fibrosis grade (88%) in the present study and
- Different methods for vitamin D determination (HPLC for Petta, *et al.*⁷ and Kitson, *et al.*²³ and electroquimioluminescence at Bitetto, *et al.*¹⁴ and in the present study).

Vitamin D levels were not associated to SVR in the present study, as previously observed among CHC patients from Australia²³ and among HIV/HCV coinfecting individuals.^{14,24} This fact could be due to the large number of individuals included in the present study or some genetic characteristics of Brazilian population, such as, miscegenous population. In the present study, SVR was statistically associated with low mean values of LDL and total cholesterol, high mean values of AST, ALT and platelets and low fibrosis grade. Berg, *et al.*²⁵ found that LDL levels (≥ 2.6 mmol/L) are associated with SVR for telaprevir-based therapy in HCV genotype 1 patients. Low fibrosis grade have been associated to high SVR rates, as demonstrated among patients infected with HCV genotypes 2 or 3 receiving PEG-IFN and ribavirin (Niederau, *et al.*²⁶). In addition, Ferreira, *et al.*²⁷ showed that high ALT values are associated with SVR among HIV/HCV infected patients in Brazil. The data found in the present study would be useful for defining successful strategies for PEG-IFN plus ribavirin treatment.

The main limitation of this study lies in its cross-sectional nature and its inability to dissect the temporal relation between 25(OH)D and laboratory data. Another limitation of this study is the lack of data on the potential confounders that may influence the levels of vitamin D, such as exposure to sunshine, dietary intake, and the prevalence of osteoporosis. Therefore, all patients involved in this study lived in Rio de Janeiro, where sunshine is abundant throughout the year. The absence of data on polymorphisms of vitamin D hydroxylating enzymes, and on other variables involved in vitamin D

metabolism, such as parathyroid hormone, and in vitamin D signaling regulation also could affect the interpretation of our results.

CONCLUSION

Vitamin D deficiency was common among Brazilian HCV infected patients and it was not associated with SVR; however a relationship of vitamin D status and some laboratory data that could potentially influence the response to therapy was observed.

FINANCIAL SUPPORT

This research was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazilian National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Brunna Lemos Crespo Marques, Elisângela Ferreira da Silva, Gabriela Cardoso Caldas, Moyra Machado Portilho for technical assistance in collecting and processing blood samples.

REFERENCES

1. Petta S, Cammà C, Scazzone C, Tripodo C, Di Marco V, Bono A, Cabibi D, et al. Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010; 51: 1158-67.
2. Steinvil A, Leshem-Rubinow E, Berliner S, Justo D, Finn T, Ish-shalom M, Birati EI, et al. Vitamin D deficiency prevalence and cardiovascular risk in Israel. *Eur J Clin Invest* 2011; 41: 263-8.
3. Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J* 2012; 441: 61-76.
4. O'Brien MA, Jackson MW. Vitamin D and the immune system: Beyond rickets. *Vet J* 2012; 194: 27-33.
5. Sung CC, Liao MT, Lu KC, Wu CC. Role of vitamin D in insulin resistance. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 634195.
6. Stokes CS, Krawczyk M, Reichel C, Lammert F, Grünhage F. Vitamin D deficiency is associated with mortality in patients with advanced liver cirrhosis. *Eur J Clin Invest* 2014; 44(2): 176-83.
7. Petta S, Grimaudo S, Marco VD, Scazzone C, Macaluso FS, Cammà C, Cabibi D, et al. Association of vitamin D serum levels and its common genetic determinants, with severity of liver fibrosis in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat* 2013; 20: 486-93.
8. Baur K, Mertens JC, Schmitt J, Iwata R, Stieger B, Eloranta JJ, Frei P, et al. Combined effect of 25-OH vitamin D plasma levels and genetic Vitamin D Receptor (NR 1H1) vari-

- ants on fibrosis progression rate in HCV patients. *Liver Int* 2012; 32: 635-43.
9. Terrier B, Jehan F, Munteanu M, Geri G, Saadoun D, Sène D, Poynard T, et al. Low 25-hydroxyvitamin D serum levels correlate with the presence of extra-hepatic manifestations in chronic hepatitis C virus infection. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51: 2083-90.
 10. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 107-15.
 11. Klenerman P, Gupta PK. Hepatitis C virus: current concepts and future challenges. *QJM* 2012; 105: 29-32.
 12. Eslam M, Aparcero R, Kawaguchi T, Del Campo JA, Sata M, Khattab MA, Romero-Gomez M. Meta-analysis: insulin resistance and sustained virological response in hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 297-305.
 13. de Rueda PM, López-Nevot MÁ, Sáenz-López P, Casado J, Martín-Casares A, Palomares P, Quiles R, et al. Importance of host genetic factors HLA and IL28B as predictors of response to pegylated interferon and ribavirin. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 1246-54.
 14. Bitetto D, Fattovich G, Fabris C, Ceriani E, Falletti E, Fornasieri E, Pasino M, et al. Complementary role of vitamin D deficiency and the interleukin-28B rs12979860 C/T polymorphism in predicting antiviral response in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011; 53: 1118-26.
 15. Nimer A, Mouch A. Vitamin D improves viral response in hepatitis C genotype 2-3 naïve patients. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 800-5.
 16. Abu-Mouch S, Fireman Z, Jarchovsky J, Zeina AR, Assy N. Vitamin D supplementation improves sustained virologic response in chronic hepatitis C (genotype 1)-naïve patients. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 5184-90.
 17. Eslam M, Kawaguchi T, Del Campo JA, Sata M, Khattab MA, Romero-Gomez M. Use of HOMA-IR in hepatitis C. *J Viral Hepat* 2011; 18: 675-84.
 18. Idrees M. Development of an improved genotyping assay for the detection of hepatitis C virus genotypes and subtypes in Pakistan. *J Virol Methods* 2008; 150: 50-6.
 19. Martínez SM, Crespo G, Navasa M, Forn X. Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Hepatology* 2011; 53: 325-35.
 20. Harrell FE Jr, Lee KL, Mark DB. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med* 1996; 15: 361-87.
 21. Ladero JM, Torrejón MJ, Sánchez-Pobre P, Suárez A, Cuenca F, de la Orden V, Devesa MJ, et al. Vitamin D deficiency and vitamin D therapy in chronic hepatitis C. *Ann Hepatol* 2013; 12: 199-204.
 22. Villar LM, Del Campo JA, Ranchal I, Lampe E, Romero-Gomez M. Association between vitamin D and hepatitis C virus infection: A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 5917-24.
 23. Kitson MT, Dore GJ, George J, Button P, McCaughan GW, Crawford DH, Sievert W, et al. Vitamin D status does not predict sustained virologic response or fibrosis stage in chronic hepatitis C genotype 1 infection. *J Hepatol* 2013; 58: 467-72.
 24. Guzmán-Fulgencio M, García-Álvarez M, Berenguer J, Jiménez-Sousa MA, Cosín J, Pineda-Tenor D, Carrero A, et al. Vitamin D deficiency is associated with severity of liver disease in HIV/HCV coinfecting patients. *J Infect* 2014; 68: 176-84.
 25. Berg T, Andreone P, Pol S, Roberts S, Younossi Z, Diago M, Lawitz EJ, et al. Low-density lipoprotein and other predictors of response with telaprevir-based therapy in treatment-experienced HCV genotype 1 patients: REALIZE study. *Liver Int* 2014.
 26. Niederau C, Mauss S, Schober A, Stoehr A, Zimmermann T, Waizmann M, Moog G, et al. Predictive factors for sustained virological response after treatment with pegylated interferon α -2a and ribavirin in patients infected with HCV genotypes 2 and 3. *PLoS One* 2014; 9: e107592.
 27. Ferreira PR, da Silva MH, Brandão-Melo CE, Rezende RE, Gonzalez M, Reuter T, Urbaz JD, et al. The clinical effectiveness of pegylated interferon and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in HIV-infected patients in Brazil: a multicentric study. *Braz J Infect Dis* 2014.

Artigo 2

Reply to contribution on the topic of hypovitaminosis D in chronic hepatitis C

Melo-Villar L, Lampe E, de Almeida AJ, de P Scalioni L, Lewis-Ximenez LL, Miguel JC, Del Campo JA, Ranchal I, Villela-Nogueira CA, Romero-Gomez M.

Situação de publicação: artigo publicado em Ann Hepatol. 2016 Jan-Feb;15(1):139-40. PubMed PMID: 26626653

Qualis: B2

Objetivo do estudo: resposta a Contribution on the topic of hypovitaminosis D in chronic hepatitis C. Basyigit *et al*, 2016.



Contribution on the topic of hypovitaminosis D in chronic hepatitis C

Sebahat Basyigit,* Ferdane Sapmaz,** Ayse Kefeli***

* Department of Gastroenterology, Artvin State Hospital, Artvin, Turkey.

** Department of Gastroenterology, Kecioren Research and Training Hospital, Ankara, Turkey.

*** Department of Gastroenterology, Siirt State Hospital, Siirt, Turkey.

Dear Editor:

We read with great interest the article by Melo-Villar, *et al.*¹ The authors demonstrated that there was an increased incidence of hypovitaminosis D in chronic hepatitis C patients. The authors also indicated that vitamin D deficiency has been associated with multiple diseases, especially with infections. We agree with the authors that there is a high prevalence of vitamin D deficiency associated with the following infections: mycobacterial, influenza, hepatitis B and C, and human immunodeficiency virus (HIV). Additionally, vitamin D has been used as a treatment for tuberculosis.²⁻⁴

The clinical impact of vitamin D in infectious disease is associated with its role in immune system modulation. Vitamin D boosts innate immunity by modulating production of anti-microbial peptides and affecting cytokine response. Nearly all cells display a specific vitamin D receptor (VDR), including B and T lymphocytes (both resting and activated), monocytes, and dendritic cells. Vitamin D exerts its immunomodulatory activity on both mononuclear and polynuclear cell lines through its effects on the VDR. Vitamin D tends to favour a mononuclear phenotype, increasing VDR expression on monocytes and macrophages. Circulating vitamin D levels have a direct influence on macrophages, increase their "oxidative burst" potential (maturation and production of cytokines, acid phosphatase and hydrogen peroxide), and prevent excessive expression of inflammatory cytokines.² Hypovitaminosis D has been shown to be associated with high interleukin-6 levels in HIV infected patients.³ Furthermore, vitamin D also facilitates both neutrophil motility and phagocyte function.²

Vitamin D requires 25-hydroxylation in the liver and subsequent 1-hydroxylation in the kidney to become biologically active. VDR polymorphisms have been associated with liver diseases such as primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis, alcohol-related hepatocarcinoma, and hepatitis B virus.⁵

Furthermore, hypovitaminosis D in infections may cause malnutrition in patients with infectious diseases.

The use of vitamin D supplementation in the treatment of infectious diseases has been considered. However, further investigations examining serum interleukin levels, VDR polymorphisms, and malnutrition status in patients with certain infections are needed to support this treatment strategy.

ABBREVIATIONS

- **HIV:** human immunodeficiency virus.
- **VDR:** vitamin D receptor.

DISCLOSURE, CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Melo-Villar L, Lampe E, de Almeida AJ, Scalioni LDP, Lewis-Ximenez LL, Miguel JC, Romero-Gomez M. Hypovitaminosis D and its relation to demographic and laboratory data among hepatitis C patients. *Ann Hepatol* 2014; 14: 457-63.
2. Youssef DA, Miller CW, El-Abbassi AM, Cutchins DC, Cutchins C, Grant WB, Peiris AN. Antimicrobial implications of vitamin D. *Dermato-endocrinology* 2011; 3: 220-9.
3. Allavena C, Delpierre C, Cuzin L, Rey D, Viget N, Bernard J, Raffi F. High frequency of vitamin D deficiency in HIV-in-

- ected patients: effects of HIV-related factors and antiretroviral drugs. *J Antimicrobial Chemotherapy* 2012; 67: 2222-30.
4. Banda R, Mhemedi B, Allain TJ. Prevalence of vitamin D deficiency in adult tuberculosis patients at a central hospital in Malawi [Short communication]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2011; 15: 408-10.
 5. Barchetta I, Carotti S, Labbadia G, Gentilucci UV, Muda AO, Angelico F, Cavallo MG. Liver vitamin D receptor, CYP2R1, and CYP27A1 expression: relationship with liver histology

and vitamin D3 levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis or hepatitis C virus. *Hepatology* 2012; 56: 2180-7.

Correspondence and reprint request: Sebahat Basyigit, M.D.
Department of Gastroenterology, Artvin State Hospital,
Artvin, Turkey.
Tel.: +905056728160
E-mail: sbuyuktemiz@yahoo.com



Reply to contribution on the topic of hypovitaminosis D in chronic hepatitis C

Livia M. Villar,* Elisabeth Lampe,* Adilson José de Almeida,* Letícia de Paula Scalioni,* Lia Laura Lewis-Ximenez,* Juliana Custódio Miguel,* José Antonio Del Campo,** Isidora Ranchal,** Cristiane Alves Villela-Nogueira,*** Manuel Romero-Gomez**

* Laboratory of Viral Hepatitis, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

** Unit for the Clinical Management of Digestive Diseases and CIBERehd, Hospital Universitario de Valme, Sevilla, Spain.

*** Hepatology Unit, Medical Clinic Department, Clementino Fraga Filho University Hospital, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil.

To The Editor,

We would like to thank Basyigit, *et al.* for their comments of on our recent study that aimed to determine pre-treatment 25(OH)D serum level among hepatitis C virus (HCV) infected individuals and its impact on virological response and laboratory data. Our main results were hepatitis C patients showed lower vitamin D level and it was associated to laboratory findings; however baseline 25(OH)D level was not independently associated with sustained virological response (SVR).

We agree authors highlighting the influence of several serum interleukine level, vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and malnutrition in vitamin D status and viral response to therapy with interferon and ribavirin. Unfortunately, these data were not available in our cohort. El Husseiny, *et al.*¹ found a negative correlation between vitamin D and serum level of IL-23 and IL-17 and MCP-1 in patients with hepatitis C genotype 4 suggesting vitamin D could be involved in immune response and fibrogenesis. In addition, studies conducted among Caucasian individuals from Europe demonstrated that genetic polymorphisms of vitamin D pathway were associated with the rate of SVR in patients infected by HCV genotypes 1-5.^{2,3} In spite of some studies demonstrated a role of vitamin D status on SVR rate in patients undergoing interferon-based antiviral therapy,⁴⁻⁶ a recent meta-analysis by Kitson, *et al.*⁷ demonstrated that baseline 25(OH)D level is not associated with SVR to peginterferon plus ribavirin, regardless of genotype. These controversies could be attributable to difference in genetic background, sun exposure and vitamin D ingestion. In order to reach definite conclusions about

the role of vitamin D on response to interferon and ribavirin it is mandatory to conduct high quality prospective clinical research studies.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

REFERENCES

1. El Husseiny NM, Fahmy HM, Mohamed WA, Amin HH. Relationship between vitamin D and IL-23, IL-17 and macrophage chemoattractant protein-1 as markers of fibrosis in hepatitis C virus Egyptians. *World J Hepatol* 2012; 4: 242-7.
2. Lange CM, Bojunga J, Ramos-Lopez E, von Wagner M, Hassler A, Vermehren J, Herrmann E, et al. Vitamin D deficiency and a CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon-alfa based therapy. *J Hepatol* 2011; 54: 887-93.
3. Falletti E, Cmet S, Fabris C, Fattovich G, Cussigh A, Bitetto D, Ceriani E, et al. Genetic polymorphisms of vitamin D pathway predict antiviral treatment outcome in slow responder naïve patients with chronic hepatitis C. *PLoS One* 2013; 8(11): e80764.
4. Villar LM, Del Campo JA, Ranchal I, Lampe E, Romero-Gomez M. Association between vitamin D and hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 5917-24.
5. Rahman AH, Branch AD. Vitamin D for your patients with chronic hepatitis C? *J Hepatol* 2013; 58: 184-9.
6. Bitetto D, Fabris C, Fornasiere E, Pipan C, Fumolo E, Cussigh A, Bignulin S, et al. Vitamin D supplementation improves response to antiviral treatment for recurrent hepatitis C. *Transp Int* 2011; 24: 43-50.

-
7. Kitson MT, Sarrazin C, Toniutto P, Eslick GD, Roberts SK. Vitamin D level and sustained virologic response to interferon-based antiviral therapy in chronic hepatitis C: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2014; 61: 1247-52.

Correspondence and reprint request: Livia M. Villar, PhD.
Viral Hepatitis Laboratory, Helio and Peggy Pereira Pavillion
Ground Floor. Room B09, FIOCRUZ Av.
Brasil, 4365. Manguinhos
Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Postal Code: 210360-040.
E-mail: lvillar@ioc.fiocruz.br

Artigo 3

Impact of Vitamin D receptor and binding protein gene polymorphisms on clinical and laboratory data of HCV patients

Scalioni LP, Santos BR, Spritzer PM, Villela-Nogueira CA, Lewis-Ximenez LL, Pollo-Flores P, Esberard EBC, Brandão-Mello CA, Lampe E, Villar LM.

Situação de publicação: artigo submetido à revista Medicine

Qualis: B2

Objetivo do estudo: o objetivo do estudo foi avaliar a influência de determinantes genéticos e concentração de 25(OH)D e sua associação com dados demográficos, metabólicos e virológicos em pacientes com hepatite C crônica residentes na América do Sul.

Medicine

Impact of Vitamin D receptor and binding protein gene polymorphisms in clinical and laboratory data of HCV patients --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	MD-D-17-04627
Article Type:	OA: Observational Study (STROBE Compliant)
Section/Category:	4900 Infectious diseases
Keywords:	Vitamin D; polymorphism; hepatitis C; fibrosis.
Corresponding Author:	Livia Melo Villar FIOCRUZ RIO DE JANEIRO, RIO DE JANEIRO BRAZIL
First Author:	Leticia de Paula Scalioni
Order of Authors:	Leticia de Paula Scalioni Betânia Rodrigues dos Santos Poli Mara Spritzer Cristiane Alves Villela-Nogueira Lia Laura Lewis-Ximenez Priscila Pollo-Flores Eliane Bordalo Cathalá Esberard Carlos Eduardo Brandão-Mello Elisabeth Lampe Livia Melo Villar
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	<p>Potential relationship of vitamin D, vitamin D receptor (VDR) and vitamin D binding protein (DBP) have been suggested in the pathophysiology of hepatitis C virus (HCV) infection. The aim of this observational study is to determine vitamin D levels, and VDR and DBP genetic polymorphism according demographic and laboratory data in chronic HCV patients (CHC). A total of 148 CHC patients gave serum samples for testing 25(OH)D level by immunochemiluminometric assay (<20 ng/mL defined as deficient) and donated blood samples to allelic discrimination analysis using TaqMan assays. Analyzed SNPs were: VDR- rs7975232 (ApaI) C>A, rs731236 A>G (TaqI), rs1544410 C>T (BsmI), rs10735810 T>C (FokI) and GC- rs4588 and rs7041 and the haplotype bAt [CCA]. Hepatic fibrosis was assessed using Fib-4 and Forns index. Eight-two (54.40%) patients demonstrated deficiency of vitamin D and this was associated to AST [p=0.019 (CI: 1.003 - 1.034)], total cholesterol [p=0.038 (CI: 1.004 - 1.164)], fibrosis grade [p<0.001 (CI: 0.000 - 0.844)], and FokI (p=0.028) allele T presence. Association was found between VDR polymorphism and fibrosis (BsmI andTaqI), triglycerides (TaqI) and HDL (FokI). DBP polymorphism was associated to HCV genotype (GC rs7041), previous HCV treatment and GGT (GC rs4588). In conclusion, low frequency of vitamin D deficiency was found, but VDR polymorphisms were frequently associated to fibrosis grade suggesting that they could be used as disease evaluation markers to understand the mechanisms underlying the virus-host interaction.</p>

Impact of Vitamin D receptor and binding protein gene polymorphisms in clinical and laboratory data of HCV patients

Letícia de Paula Scalioni¹, Msc; Betânia Rodrigues dos Santos², PhD; Poli Mara Spritzer², PhD; Cristiane Alves Villela-Nogueira³, MD, PhD; Lia Laura Lewis-Ximenez¹, MD, PhD; Priscila Pollo-Flores⁴, MD, PhD; Eliane Bordalo Cathalá Esberard⁵, MD, Msc.; Carlos Eduardo Brandão-Mello⁶, MD, PhD; Elisabeth Lampe¹, PhD.; Livia Melo Villar¹, PhD.

¹*Laboratory of Viral Hepatitis, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.*

²*Gynecological Endocrinology Unit Division of Endocrinology Porto Alegre Clinical Hospital, Department of Physiology Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.*

³*Hepatology Unit, Medical Clinic Department, Clementino Fraga Filho University Hospital, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil*

⁴*Brasilia University, UNB*

⁵*Antonio Pedro University Hospital, Federal Fluminense University, Rio de Janeiro, Brazil.*

⁶*Gaffree Guinle Hospital, Federal University of Rio de Janeiro State, Rio de Janeiro, Brazil*

Correspondence to: Livia Melo Villar, Viral Hepatitis Laboratory, Helio and Peggy Pereira Pavillion - Ground Floor - Room B09, FIOCRUZ Av. Brasil, 4365 - Manguinhos – Rio de Janeiro, RJ, Brazil Postal Code: 210360-040. E-mail: lvillar@ioc.fiocruz.br /
Financial Support: Faperj, Cnpq, Fiocruz and Capes

Running Title: VITAMIN D POLYMORPHISM AND HEPATITIS C

ABSTRACT

Potential relationship of vitamin D, vitamin D receptor (VDR) and vitamin D binding protein (DBP) have been suggested in the pathophysiology of hepatitis C virus (HCV) infection. The aim of this observational study is to determine vitamin D levels, and VDR and DBP genetic polymorphism according demographic and laboratory data in chronic HCV patients (CHC). A total of 148 CHC patients gave serum samples for testing 25(OH)D level by immunochemiluminometric assay (<20 ng/mL defined as deficient) and donated blood samples to allelic discrimination analysis using TaqMan assays. Analyzed SNPs were: VDR- *rs7975232 (ApaI) C>A*, *rs731236 A>G (TaqI)*, *rs1544410 C>T (BsmI)*, *rs10735810 T>C (FokI)* and GC- *rs4588* and *rs7041* and the haplotype bAt [CCA]. Hepatic fibrosis was assessed using Fib-4 and Forns index. Eight-two (54.40%) patients demonstrated deficiency of vitamin D and this was associated to AST [p=0.019 (CI: 1.003 – 1.034)], total cholesterol [p=0.038 (CI: 1.004 – 1.164)], fibrosis grade [p<0.001 (CI: 0.000 – 0.844)], and FokI (p=0.028) allele T presence. Association was found between VDR polymorphism and fibrosis (BsmI and TaqI), triglycerides (TaqI) and HDL (FokI). DBP polymorphism was associated to HCV genotype (GC rs7041), previous HCV treatment and GGT (GC rs4588). In conclusion, low frequency of vitamin D deficiency was found, but VDR polymorphisms were frequently associated to fibrosis grade suggesting that they could be used as disease evaluation markers to understand the mechanisms underlying the virus-host interaction.

Key words: Vitamin D; polymorphism; hepatitis C; fibrosis.

1. INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic hepatitis responsible for more >185 million worldwide accounting a seroprevalence of 2.8%^(1,2,3). While the incidence rate of HCV infection is decreasing in the developed countries, deaths from liver disease secondary to HCV infection will continue to increase over the next 20 years⁽⁴⁾.

In low- and middle-income countries, interferon and ribavirin-based therapies are the first choices due to their availability and low cost. The combination of ribavirin (RBV) and pegylated-interferon-alpha (peg-IFN- α) was considered the standard treatment for HCV infection in the last decade where those infected by genotypes 1 and 4 are treated for 48 weeks and those infected by genotypes 2 and 3 are treated for 24 weeks⁽⁵⁾. Recently, the use of direct acting antivirals has proven effective against HCV in developed countries, significantly decreasing morbidity and mortality. However, low- and middle-income countries, most of which are highly endemic areas, access to new antiviral drugs still is restricted due to high cost⁽⁶⁾.

Several predictors of successful treatment of chronic hepatitis C using interferon and ribavirin have been identified^(7,8), such as factors related to the virus (infection by HCV genotype 2-3, basal HCV viral load, and HCV genetic variability) or to the host (liver inflammation, fibrosis, lower serum cholesterol values and interleukin 28B (IL-28B) polymorphisms C/C, vitamin D concentration)⁽⁹⁻¹¹⁾.

Calcitriol is an important modulator in the immune pathways, and is also known to be involved in cell proliferation and differentiation⁽¹²⁾. Most of its biological effects are mediated through the vitamin D receptor (VDR), a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcription factors⁽¹³⁻¹⁵⁾ and directed to these cells connected with a binding protein. GC-globulin is the main serum vitamin D binding protein; it is polymorphic and characterized in Caucasian populations by a great variability at two loci (rs7041 and rs4588)⁽¹⁶⁾.

The presence of the minor alleles in GC-globulin loci has been associated with lower circulating vitamin D levels⁽¹⁷⁾, instead VDR polymorphisms has been associated with rapid fibrosis progression (haplotype bAt[CCA])⁽¹⁸⁾. Vitamin D deficiency has been associated to low sustained virological response (SVR) among hepatitis C patients^(19,20). Moreover, vitamin D levels and SNPs involved in its metabolism have been related to anti-

HCV therapy response⁽²¹⁻²³⁾. In this way, our aim is to evaluate the influence of genetic determinants of 25(OH)D serum levels and the association with demographic, metabolic and virological data in chronic HCV patients living in South America.

2. METHODS

2.1 Study design and population

This is an observational study that included 148 chronic hepatitis C patients (CHC) resident in Rio de Janeiro recruited at Viral Hepatitis Ambulatory (Viral Hepatitis Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ), Hepatology Unit (Clementino Fraga Filho University Hospital, UFRJ), General Medicine Department (Gaffrée Guinle University Hospital, UNIRIO) and Hepatology Unit (Antonio Pedro University Hospital, UFF). Non-probabilistic recruitment was conducted from 2011 to 2012 year.

Patients were included if they had a virological diagnosis of CHC [anti-HCV and HCV-RNA reactive serum sample, with persistently abnormal alanine aminotransferase (ALT), at least 6 months] and more than 18 years of age. The infecting HCV genotypes were the following: 1, 2, 3 and 5. Patients were excluded if they were positive for serum hepatitis B surface antigen or anti-human immunodeficiency virus antibody, or exhibited other causes of hepatocellular injury (e.g., any history of alcoholism, autoimmune hepatitis, advanced cirrhosis, or treatment with hepatotoxic drugs) and, concomitant use of drugs known to affect serum vitamin D concentration and intravenous drug use. These factors were excluded due to potential source of bias.

This study was approved by the Ethics Committee of FIOCRUZ (CAAE 41269015.3.0000.5248). Informed consent was obtained from each patient who was included in the study, and the study protocol was followed according to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

2.2 Clinical and laboratorial data

All serum samples were tested for anti-HCV using commercial EIA kit HCV Ab (Radim, Pomezia, Italy), where all anti-HCV-reactive samples were retested in duplicate.

HCV RNA viral load was determined using CobasTaqMan HCV Test (Roche Molecular Systems, Inc, Basel, Switzerland) or Abbott Real Time HCV m2000sp (Abbott Laboratories, Illinois, USA) and expressed as IU/mL. HCV genotyping was performed using INNO-LIPA HCV II kit (Innogenetics, Zwijnaarden, Belgium) or Abbott Real Time HCV m2000sp (Abbott Laboratories, Illinois, USA) according manufacturer's instruction.

Clinical and demographic data were collected simultaneously from all patients. A 12-h overnight fasting blood sample was draw, to determine serum levels of ALT, gamma-glutamyltransferase (GGT), total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL), triglycerides, plasma glucose concentration, and platelet count.

Baseline serum vitamin D level was assessed by measuring serum 25-hydroxyvitamin D levels using automated immunochemiluminometric assay (ICMA) (Liason 25 (OH) Vitamin D, Diasorin, Varceli, Italy) with 20 ng/mL being considered the threshold value. Serum insulin was also determined using ICMA (Liason Insulin Assay, Diasorin, Varceli, Italy). Insulin resistance (IR) was determined using homeostasis model assessment method ($HOMA \geq 2$)⁽²⁴⁾.

Hepatic fibrosis was assessed using Fib-4 and Forns index as the same as described previously (25). When Fib-4 was less than 1.45, individual was considered as low fibrosis, and if Fib-4 was ≥ 1.45 , Forns index was considered. Forns index below 4.2 were considered as low fibrosis, and index above or equal to 4.2 were considered high fibrosis⁽²⁵⁾.

Genomic DNA was obtained from whole blood samples using QIamp DNA Mini Kit (Quiagen, Valencia, CA). The purified and elute DNA was quantified using a Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific, Rockford, IL). Thereafter, DNA was diluted in UltraPure DNase/RNase-Free water (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA) to a concentration of 2 ng. The allelic discrimination analysis was performed using the TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at ViiA7 Real-Time PCR System 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). TaqMan Master mix (2.5 μ L), TaqMan assay (0.25 μ L), and H₂O (1.25 μ L) were added to a final volume of 4 μ L per sample, and 1 μ L of DNA was added for a total reaction volume of 5 μ L. Reaction conditions for SNPs ApaI, FokI, TaqI and rs4588 were: 10 min at 95°C after

50 cycles of denaturation at 95°C (15 s) and annealing at 60°C (1 min). To genotyping SNPs BsmI and rs7041 TaqMan Master mix (5.0µL), TaqMan assay (0.50 µL), and H₂O (3.5µL) were added to a final volume of 9µL per sample, and 1µL of DNA was added for a total reaction volume of 10µL. Reaction conditions for these polymorphisms were: 10 min at 95°C after 50 cycles of denaturation at 95°C (15 s) and annealing at 60°C (1min) to BsmI and 61°C (1 min) to rs7041 ⁽²⁶⁾.

We selected tag-SNPs from vitamin D metabolism-related genes, VDR and GC and the haplotype bAt [CCA]. These SNPs were chosen using previous literature information^(18,19,26,27,28). Public databases were used to collect additional information about SNPs and genes: NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

The analyzed SNPs were: VDR- *rs7975232 (ApaI) C>A*, *rs731236 A>G (TaqI)*, *rs1544410 C>T (BsmI)*, *rs10735810 T>C (FokI)* and GC- *rs4588* and *rs7041*.

Haplotypes were constructed from the combination of the VDR polymorphisms BsmI, ApaI and TaqI {bAt [CCA] [{"b"} (BsmI allele C), "A" (ApaI allele C) and, "t" (TaqI allele A)]} and their frequencies were inferred using the PHASE 2.1.1 program (Matthew Stephens Lab, University of Chicago). To predict that both allele frequencies will remain constant because they are in equilibrium, we calculated the Hardy-Weinberg equilibrium by χ^2 ($p < 0.05$).

2.4 Statistical Analysis

Continuous data are expressed as mean \pm standard deviation, and the categorical data are expressed as number (percentage). Comparisons of differences in categorical data between groups were performed using the Chi-square test. Distributions of continuous variables were analyzed by the Student t test or Mann Whitney U test for the two groups where appropriate. Missing data was presented in tables when appropriate. Independent factors possibly affecting 25(OH)D concentration (cut off value of 20 ng/mL) were determined by stepwise multiple logistic regression analysis.

Hardy-Weinberg equilibrium for each SNP were compared using the Pearson chi-square test (χ^2). 25(OH)D concentration and the variance in each genotype was accessed in One-Way ANOVA with Bonferroni's correction. At univariate analyses, *p-value* were

considered significant when $p < 0.2$ and in multivariate analyze $p < 0.05$. All the tests were performed with IBM SPSS Statistics 20.0 for Windows (Chicago, Illinois, USA).

3. RESULTS

3.1 Baseline characteristics

Demographic, virological, and clinical features of population studied are shown in Table 1. There were 56 men and 92 women, with mean age of 54.41 (± 11.27). Elevated mean of ALT, AST, phosphatase, GGT, blood glucose, total cholesterol and, LDL serum levels were observed in patients.

Normal median values were observed for: VLDL (19.82 ± 10.83 mg/dL), HDL (54.80 ± 20.86 mg/dL), platelets (20479.70492 ± 60563.37 103/mm), hematocrit (40.64 ± 6.48 %) and hemoglobin (13.64 ± 1.78 ng/mL) (anemic classification: hemoglobin values < 12 ng/mL for women and < 13 ng/mL for men). Using the cutoff value of 20 ng/mL, 82/148 (54.40%) patients demonstrated deficiency of vitamin D. HCV RNA viral load (log mean) was high and most prevalent genotype was 1 (88.37%). During this study, 68 CHC patients were treated for HCV using PEG-IFN and ribavirin and in this subgroup, 46 (31.08%) did not achieve SVR. Sixty-eight patients (45.94%) were not treated for HCV. Using fibrosis algorithm, 52.00% ($n=77$) presented high level. The HOMA index mean was also lower than the cutoff established in this work (1.99 ± 3.33), where 33.10% ($n=49$) presented IR.

3.2 Association between serum 25(OH)D levels, clinical and viral data in chronic HCV patients

To assess the relationship among 25(OH)D concentration and demographic and laboratory data in HCV patients, a cutoff value was established (deficiency < 20 ng/mL). High mean values of age ($p=0.042$), AST ($p=0.022$), HDL ($p=0.072$), triglycerides (0.047), SVR ($p=0.108$), and presence of high fibrosis ($p=0.016$) were associated to 25(OH)D deficiency at univariate analysis.

Patients with high rates of platelets presented 25(OH)D ≥ 20 ng/mL ($p=0.014$), as also blood glucose ($p=0.106$) and ALT ($p=0.160$) were high in patients with 25(OH)D ≥ 20

ng/mL (Table 2). At multiple linear regression analysis, AST [$p=0.019$ (CI: 1.003 – 1.034)], total cholesterol [$p=0.038$ (CI: 1.004 – 1,164)], and, fibrosis grade [$p<0.001$ (CI: 0.000 – 0.844)] were significant.

3.3 Association between VDR and GC polymorphism according 25(OH)D level among HCV patients

To study the implication of these SNPs and 25(OH)D concentration according clinical and laboratory data of HCV patients, first our sample was categorized according to previously defined cutoff value [25(OH)D deficiency < 20 ng/mL]. Second, the alleles were categorized in risk allele/non-risk allele and grouped and, presence/absence of haplotype bAt [CCA]. The genotype distribution of all investigated SNPs was in Hardy-Weinberg equilibrium. Only FokI was statistically significant ($p=0.028$), where allele T were associated with 25(OH)D ≥ 20 ng/mL.

After this, the One-way ANOVA test with Bonferroni's multiple comparison post test ($p<0,05$) were done. There was no statistically difference between SNPs genotypes and 25(OH)D concentration in 148 Brazilian CHC patients (Figure 1). ApaI: [CC vs. CA ($t=0.172$), CC vs. AA ($t=0.199$), CA vs. AA ($t=0.430$)]; TaqI: [AA vs. AG ($t=0.806$), AA vs. GG ($t=0.990$), AG vs. GG ($t=0.497$)]; BsmI: [CC vs. CT ($t=1.281$), CC vs. TT ($t=0.564$), CT vs. TT ($t=0.278$)]; FokI: CC vs. CT ($t=1.786$), CC vs. TT ($t=0.961$), CT vs. TT ($t=2.040$); GC rs4588: AA vs. AC ($t=0.927$), AA vs. CC ($t=0.101$), AC vs. CC ($t=1.515$); GC rs7041: [TT vs. TG ($t=0.610$), TT vs. GG ($t=2.001$), TG vs. GG ($t=1.565$)].

Besides that, we carried out a bivariate and a linear regression analysis by comparing favorable allele group with demographic, biochemical and viral data. The significant results are given in table 3. In the multivariate analysis, using SPNs as dependent variable, we found association between BsmIrs1544410 (fibrosis algorithm), TaqI rs731236 (triglycerides and fibrosis algorithm), FokI rs10735810 (HDL), GC rs4588 (treated and none-treated and, GGT) and, GC rs7041 (genotype 1 and none-1).

4. DISCUSSION

In vitamin D pathway, a series of studies had reported on interaction between vitamin D-related genes and 25(OH)D levels. Among them, vitamin D receptor and vitamin

D-Binding protein (DBP) genes played an important role in vitamin D pathway. Previous studies had shown that genetic variations in these genes had a significant effect on vitamin D levels in many populations including the Chinese^(29,30), Japanese⁽³¹⁾, Caucasian^(16,17,19,20,27), Brazilian healthy girls⁽²⁶⁾, and in this study, FokI C allele in Brazilian CHC patients were associated to 25(OH)D < 20 ng/mL.

This way, we hypothesized that genetic determinants of 25(OH)D serum levels may be associated with demographic, metabolic and virological data in chronic HCV Brazilian patients. To our knowledge, this is the first study that describes the interaction between vitamin D-related genes and 25(OH)D levels among HCV infected patients from South America giving some new insight about these parameters in tropical regions.

In this study, the prevalence of vitamin D deficiency was 55.04% that is lower than previously observed in similar population in Brazil (63%)⁽²⁵⁾ and among Italians HCV patients (73%)^(20,22,23,32). Moreover, severe fibrosis was found in patients with lower vitamin D concentration (Table 2). Lange et al.⁽¹⁹⁾ published a large study of non-cirrhotic patients with chronic HCV infection where vitamin D status was assessed in a cohort of 468 patients and the prevalence of vitamin D deficiency was greater in patients with more advanced fibrosis, according our founding. Others studies found the contrary⁽¹⁵⁾. These differences can be explained because of variation in the 25(OH)D assay used, vitamin D cutoff and, the different ethnicities and geographic latitude of populations studied, and clinical trials.

Vitamin D deficiency is common among patients with liver diseases. Whether vitamin D status can also affect liver function is poorly understood. In this study, low 25(OH)D concentration was associated with high AST and cholesterol total value. Skaaby et al⁽³³⁾ investigate the association between vitamin D status, liver enzymes, and incident liver disease in 2,649 individuals and found that the risk of having a high level of ALT, AST, or GGT tended to be higher for lower vitamin D levels, in accordance with our results. There is conflicting information when it comes to the link between cholesterol and vitamin D. Population studies show that people with lower vitamin D levels are more likely to have high cholesterol, although this does not prove a cause and effect relationship despite being according our findings⁽³⁴⁾. To the National Institutes of Health, there is

insufficient evidence to determine any relationship between vitamin D intake and cholesterol levels.

A strong association of vitamin D sufficiency to TT genotype in FokI was found. This way, FokI C>T polymorphisms may be used as a molecular marker to predict the risk and to evaluate the disease severity of HCC in those infected with HCV since low concentrations of vitamin D is directly associated with increased liver injury in Brazilian population. Differently, Shehab et al. ⁽³⁵⁾ observed that VDR genetic polymorphisms are significantly associated with the occurrence of HCV related HCC especially T allele carriers which could be considered as a risk factor of hepatocellular carcinoma in Egyptian patients.

Regarding VDR and DBP genes polymorphisms in Brazilian population, the BsmI, ApaI, TaqI and the rs4588 and rs7041 polymorphisms were most consistently associated with lower 25(OH)D levels ^(26,35). However, in the present study both of these SNPs were not associated with lower levels of 25(OH)D after applying Bonferroni's correction, in accordance with Zhang's study in Chinese population. Nevertheless, Falletti et al (16), demonstrated that normal serum vitamin D levels and the carriage of GC-globulin WT isoform strongly predicts the achievement of SVR after PEG-interferon plus ribavirin antiviral therapy. Some studies found that the carriage of ApaI CC genotype and TaqI AA genotype had significant higher viral load as compared to those with ApaI CA/AA type and TaqI AG type, respectively (28). Besides that, VDR gene variants can modulate biological effects of vitamin D without influencing serum vitamin D levels ^(15,36).

Some variables could explain these differences. It is well established that there are racial differences in the relations between the 25(OH)D concentrations, parathyroid hormone concentration, and calcium homeostasis ⁽¹⁴⁾. Racial differences in vitamin D physiology or race-specific factors that modify the effects of vitamin D may affect the immune response to HCV ⁽³⁷⁾.

We did not find a significant association between VDR bAt [CCA] haplotype and clinical and laboratory data in HCV patients as the same as Hung et al ⁽²⁸⁾ who also did not find any relationship between this haplotype and response to peginterferon plus ribavirin therapy. These genetic variations have been described as important modulators of several chronic liver diseases such as primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis ⁽³⁸⁾.

In the present study, fibrosis was associated to BsmI rs1544410 and TaqI rs731236 what was not observed among Chinese population with chronic HCV infection ⁽²⁸⁾. To explain the relation between high serum triglycerides and the effect of TaqI rs731236 a hypothetical explanations is related to the mechanism in which vitamin D induces the expression of VLDL-cholesterol receptors in some types of cell ⁽³⁹⁾. This situation is associated with an elevation of the levels of VLDL and triglycerides, and is common in CHC patients ⁽⁴⁰⁾. The relationship between HCV genotype and GC remains unknown.

This study presents some limitations, like the absence of race information or ancestry profile, sun exposure, and season of collection that could create some bias regarding vitamin D measures. In conclusion, the present study suggests a significant association of VDR FokI rs10735810 and the 25(OH)D concentration in CHC patients, strong association between fibrosis algorithm, 25(OH)D, BsmI rs15444 and, TaqI rs731236, and finally the association between GC rs7041 (Genotype 1/ None-1). These data could provide helpful information for understanding the complex mechanisms underlying the virus-host interaction and the variations observed in antiviral therapy responses.

FUNDING/SUPPORT STATEMENT

Supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazilian National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), and Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ).

ACKNOWLEDGMENT

Authors would like Adilson José de Almeida for clinical assessment, Juliana Custódio Miguel and Elisangela Ferreira da Silva for technical assistance in serological tests and Vanessa Alves Marques for technical assistance in molecular assays.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest."

REFERENCES

1. Georgel P, Schuster C, Zeisel MB, Stoll-Keller F, Berg T, Bahram S, et al. Virus–host interactions in hepatitis C virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies. *Trends Mol Med* 2010;16:277–286. Available from: doi: 10.1016/j.molmed.2010.04.003
2. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41–52. Available from: doi:10.1056/NEJM200107053450107
3. Mastro TD, Morrison CS, Hamilton CD. Determining the Incidence of Hepatitis C Virus Infection in Populations: An Important Tool for Epidemic Control. *J Infect Dis* 2016;214:339–340. Available from: doi: 10.1093/infdis/jiw006
4. Razavi H, Elkhoury AC, Elbasha E, Estes C, Pasini K, Poynard T, et al. Chronic hepatitis C virus (HCV) disease burden and cost in the United States. *Hepatology* 2013;57:2164–2170. Available from: doi: 10.1002/hep.26218
5. Jacobson IM, Pawlotsky J-M, Afdhal NH, Dusheiko GM, Forns X, Jensen DM, et al. A practical guide for the use of boceprevir and telaprevir for the treatment of hepatitis C. *J Viral Hepat* 2012;19:1–26. Available from: doi: 10.1111/j.1365-2893.2012.01590.x
6. Yilmaz H, Yilmaz EM, Leblebicioglu H. Barriers to access to hepatitis C treatment. *J Infect Dev Ctries* 2016;10. Available from: doi: 10.3855/jidc.7849
7. Asselah T, Estrabaud E, Bieche I, Lapalus M, De Muynck S, Vidaud M, et al. Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin. *Liver Int* 2010;30:1259–1269. Available from: doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02283.x
8. Fattovich G, Covolo L, Bibert S, Askarieh G, Lagging M, Clément S, et al. IL28B polymorphisms, IP-10 and viral load predict virological response to therapy in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33:1162–1172. Available from: doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04635.x
9. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, et al. Genetic Variation in IL28B Is Associated With Chronic Hepatitis C and Treatment Failure:

- A Genome-Wide Association Study. *Gastroenterology* 2010;138:1338–1345.
Available from: doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.056
10. Villar LM, Del Campo JA, Ranchal I, Lampe E, Romero-Gomez M. Association between vitamin D and hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2013;19:5917–5924. Available from: doi: 10.3748/wjg.v19.i35.5917
 11. Assone T, Paiva A, Fonseca LAM, Casseb J. Genetic Markers of the Host in Persons Living with HTLV-1, HIV and HCV Infections. *Viruses* 2016;8:38. Available from: doi: 10.3390/v8020038
 12. von Essen MR, Kongsbak M, Schjerling P, Olgaard K, Odum N, Geisler C. Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells. *Nat Immunol* 2010;11:344–349. Available from: doi: 10.1038/ni.1851
 13. Rukin NJ, Strange RC. What are the frequency, distribution, and functional effects of vitamin D receptor polymorphisms as related to cancer risk? *Nutr Rev* 2007;65: 96-101. Available from: doi:10.1111/j.1753-4887.2007.tb00350.x
 14. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JBJ, Pols HAP, Van Leeuwen JPTM. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004;338:143–56. Available from: doi: 10.1016/j.gene.2004.05.014
 15. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010;376:180–188. Available from: doi: 10.1016/S0140-6736(10)60588-0
 16. Falletti E, Bitetto D, Fabris C, Fattovich G, Cussigh A, Cmet S, et al. Vitamin D binding protein gene polymorphisms and baseline vitamin D levels as predictors of antiviral response in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2012;56:1641–1650. Available from: doi: 10.1002/hep.25848
 17. Zierold C, Mings JA, DeLuca HF. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone. *J Cell Biochem* 2003;88:234–237. Available from: doi: 10.1002/jcb.10341
 18. Baur K, Mertens JC, Schmitt J, Iwata R, Stieger B, Frei P, et al. The vitamin D receptor gene bAt (CCA) haplotype impairs the response to pegylated-interferon/ribavirin-based therapy in chronic hepatitis C patients. *Antivir Ther*

- 2012;17:541–547. Available from: doi: 10.3851/IMP2018
19. Lange CM, Bojunga J, Ramos-Lopez E, von Wagner M, Hassler A, Vermehren J, et al. Vitamin D deficiency and a CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon-alfa based therapy. *J Hepatol* 2011;54:887–893. Available from: doi: 10.1016/j.jhep.2010.08.036
 20. Ladero JM, Torrejón MJ, Sánchez-Pobre P, Suárez A, Cuenca F, de la Orden V, et al. Vitamin D deficiency and vitamin D therapy in chronic hepatitis C. *Ann Hepatol*;12:199–204.
 21. D’Avolio A, Ciancio A, Siccardi M, Smedile A, Simiele M, Cusato J, et al. Negative predictive value of IL28B, SLC28A2, and CYP27B1 SNPs and low RBV plasma exposure for therapeutic response to PEG/IFN-RBV treatment. *Ther Drug Monit* 2012;34:722–728. Available from: doi: 10.1097/FTD.0b013e318272e55a
 22. Bitetto D, Fabris C, Falletti E, Toniutto P. Vitamin D deficiency and HCV chronic infection: what comes first? *J Hepatol* 2011;55:944–945. Available from: doi: 10.1016/j.jhep.2011.01.044
 23. Bitetto D, Fabris C, Fornasiere E, Pipan C, Fumolo E, Cussigh A, et al. Vitamin D supplementation improves response to antiviral treatment for recurrent hepatitis C. *Transpl Int* 2011;24:43–50. Available from: doi: 10.1111/j.1432-2277.2010.01141.x
 24. Eslam M, Kawaguchi T, Del Campo JA, Sata M, Khattab MA-E, Romero-Gomez M. Use of HOMA-IR in hepatitis C. *J Viral Hepat* 2011;18:675–684. Available from: doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01474.x
 25. Melo-Villar L, Lampe E, de Almeida AJ, de P Scalioni L, Lewis-Ximenez LL, Miguel JC, et al. Hypovitaminosis D and its relation to demographic and laboratory data among hepatitis C patients. *Ann Hepatol*;14:457–463.
 26. Santos BR, Mascarenhas LPG, Boguszewski MCS, Spritzer PM. Variations in the vitamin D-binding protein (DBP) gene are related to lower 25-hydroxyvitamin D levels in healthy girls: a cross-sectional study. *Horm Res Paediatr* 2013;79:162–168. Available from: doi: 10.1159/000348847
 27. Lange CM, Bibert S, Kutalik Z, Burgisser P, Cerny A, Dufour J-F, et al. A genetic validation study reveals a role of vitamin D metabolism in the response to interferon-

- alfa-based therapy of chronic hepatitis C. *PLoS One* 2012;7: 40159. Available from: doi: 10.1371/journal.pone.0040159
28. Hung C-H, Hu T-H, Lu S-N, Chen C-H, Wang J-H, Lee C-M. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with response to peginterferon plus ribavirin in Asian patients with chronic hepatitis C. *J Formos Med Assoc* 2016;115:278–283. Available from: doi: 10.1016/j.jfma.2015.11.008
 29. Gong Y-G, Li Y-N, Zhang W-H, Liu L-J, Kang X-G. Correlation between vitamin D receptor genetic polymorphism and 25-hydroxyvitamin D3 in vitamin D deficiency rickets. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2010;12:544–546.
 30. Ren Y, Liu M, Zhao J, Ren F, Chen Y, Li J-F, et al. Serum vitamin D₃ does not correlate with liver fibrosis in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2015;21:11152–11159. Available from: doi: 10.3748/wjg.v21.i39.11152
 31. Miki D, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Yoshima T, Aikata H, et al. Variation in the DEPDC5 locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers. *Nat Genet* 2011;43:797–800. Available from: doi: 10.1038/ng.876
 32. Petta S, Cammà C, Scazzone C, Tripodo C, Di Marco V, Bono A, et al. Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010;51:1158–1167. Available from: doi: 10.1002/hep.23489
 33. Skaaby T, Husemoen LLN, Borglykke A, Jørgensen T, Thuesen BH, Pisinger C, et al. Vitamin D status, liver enzymes, and incident liver disease and mortality: a general population study. *Endocrine* 2014;47:213–220. Available from: doi: 10.1007/s12020-013-0107-8
 34. Hsia J, Heiss G, Ren H, Allison M, Dolan NC, Greenland P, et al. Calcium/vitamin D supplementation and cardiovascular events. *Circulation* 2007;115:846–854. Available from: doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.673491
 35. Shehab H, Sabry D, Mukhtar M, Elakel W, Mabrouk M, Zahra A, et al. Vitamin D Receptor FokI Gene Polymorphism Predicted Poor Response to Treatment in Chronic HCV Genotype 4. *Int J Biomed* 2016;6:265–270. Available from: doi: 10.21103/Article6(4)_OA3

36. Santos BR, Mascarenhas LPG, Satler F, Boguszewski MCS, Spritzer PM. Vitamin D deficiency in girls from South Brazil: a cross-sectional study on prevalence and association with vitamin D receptor gene variants. *BMC Pediatr* 2012;12:62. Available from: doi: 10.1186/1471-2431-12-62
37. Gutiérrez OM, Farwell WR, Kermah D, Taylor EN. Racial differences in the relationship between vitamin D, bone mineral density, and parathyroid hormone in the National Health and Nutrition Examination Survey. *Osteoporos Int* 2011;22:1745–1753. Available from: doi: 10.1007/s00198-010-1383-2
38. Fan L, Tu X, Zhu Y, Zhou L, Pfeiffer T, Feltens R, et al. Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis in the Chinese. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:249–255. Available from: doi: 10.1111/j.1440-1746.2005.03532.x
39. Ochs-Balcom HM, Chennamaneni R, Millen AE, Shields PG, Marian C, Trevisan M, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with adiposity phenotypes. *Am J Clin Nutr* 2011;93:5–10. Available from: doi: 10.3945/ajcn.2010.29986.
40. Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Archives of Medical Research* 2005; 36: 232–240. Available from: doi: 10.1016/j.arcmed.2005.01.005.

Figure Legend: Figure 1. Association of VDR and GC gene polymorphism with 25 (OH) D concentration in Brazilian chronic HCV patients. No significant variance was found using ANOVA I test with Bonferroni's correction ($p < 0.05$).

Table 1. Demographic, laboratory and, metabolic data of 148 chronic hepatitis patients (CHC).

Variable	Value
Age (years)	54.41 (\pm 11.27)
Gender	
<i>F</i>	92 (62.2%)
<i>M</i>	56 (37.8%)
25(OH)D ng/mL	23.08 (\pm 10.48)
HCV RNA IU/mL	571000,000 (12 – 30600000,00)
Log	5.75 (1.08 – 7.48)
Glucose ng/mL	107.66 (\pm 47.28)
AST UI/mL	76.00 (4 – 397)
ALT UI/mL	69.00 (\pm 58.33)
VLDLmg/dL	19.82 (\pm 10.83)
LDLmg/dL	151.96 (\pm 190.94)
HDL mg/dL	54.80 (\pm 20.86)
Triglycerides mg/dL	102.52 (\pm 45.90)
Total cholesterol mg/dL	233.75 (\pm 197.55)
γ GT UI/mL	124.62 (\pm 121.55)
Insulin μ U/mL	18.60 (\pm 24.56)
HOMA	1.99 (\pm 3.33)
APRI	1.61 (\pm 2.25)
FORNS	3.42 (\pm 7.01)
Fib-4	3.84 (\pm 4.46)
TSH	3.34 (\pm 7.77)
Hemoglobin ng/mL	13.64 (\pm 1.78)
Hematocrit (%)	40.64 (6.48)
Phosphatase UI/mL	111.32 (\pm 85.54)
Platelets 10^3 /mm	20479.70492 (\pm 60563.37)
Antiviral treatment	
Without sustained virological response (SVR)	46 (31.08%)
With SVR	22 (14.86%)
No treatment	68 (45.94%)
Genotype*	
<i>I</i>	114 (88.37%)
<i>None-1</i>	15 (11.62%)
25(OH)D	
< 20	82 (55.40%)
\geq 20	66 (44.60%)
HOMA	
< 2	49 (33.10%)
\geq 2	99 (66.90%)
Fibrosis algorithm*	
<i>Low</i>	41 (27.70%)
<i>High</i>	77 (52.00%)

Continuous variables are expressed as mean value \pm standard deviation. ALT: alanine aminotransferase. AST: aspartate aminotransferase. γ GT: gamma glutamyltransferase. HDL: high- density lipoprotein; VLDL: very low-density lipoprotein LDL: low- density lipoprotein. HOMA: homeostatic model assessments. * with missing data.

Table 2. Univariate and multivariate regression analysis of factors associated with 25(OH) concentration.

Variable	25(OH)D ng/mL		Bivariate analysis <i>P</i> value	Multivariate analysis <i>P</i> (CI)
	< 20	≥ 20		
Age (years)	57 (±9)	52 (±12)	0.042	0.967 (0.943 – 1.063)
Gender				
Female, n	47(%)	45(%)	0.041	0.882 (0.254-4.937)
Male, n	19(%)	37(%)		
Log	5.38 (±1.60)	5.082 (±1.84)	0.572	–
Glucose ng/mL	105.89 (±45.06)	109.26 (±49.51)	0.106	0.102 (0.992 – 1.093)
AST UI/mL	100.45 (±67.45)	79.73 (±42.97)	0.022	0.019 (1.003 – 1.034)
ALT UI/mL	59.80 (±49.30)	77.09 (±64.18)	0.160	0.109 (0.853 – 1.016)
VLDLmg/dL	21.74 (±10.32)	17.83 (±11.08)	0.205	–
LDLmg/dL	162.42 (±199.99)	141.51 (±182.62)	0.357	–
HDL mg/dL	57.48 (±20.71)	52.01 (±20.84)	0.072	0.075 (0.983 – 1.429)
Tg mg/dL	108.71 (±51.80)	96.10 (±86)	0.344	–
Tc mg/dL	251.21 (±207.63)	215.62 (±186.76)	0.047	0.038 (1.004 – 1,164)
γGT UI/mL	131.21 (±141.62)	119.18 (±102.70)	0.824	–
TSH	4.75 (±10.85)	2.0 (±1.640)	0.040	0.110 (0.669 – 52.71)
Hemoglobin ng/mL	13.59 (±1.37)	13.69 (±2.08)	0.422	–
Hematocrit (%)	40.54 (5.16)	40.79 (7.48)	0.232	–
Phosphatase UI/mL	116.57 (±96.27)	106.98 (±75.90)	0.532	–
Platelets10 ³ /mm	5162.316 (±21730.170)	33911.87 (±78289.79)	0.014	0.087 (0.932 – 1.005)
Response to antiviral treatment (n=68) *			0.108	0.5 (0.035 – 969.661)
SVR, n	5	17		
Without SVR, n	21	25		
Genotype (n=129) *				
<i>I</i>	46	68	0.341	–
<i>None-I</i>	8	7		
HOMA				
<2	46	53	0.517	–
≥2	20	29		
Fibrosis algorithm (n=118)*				
<i>Low</i>	13	28	0.016	0.000 (0.000 – 0.844)
<i>High</i>	43	34		

Continuous variables are expressed as mean value ± standard deviation. ALT: alanine aminotransferase. AST: aspartate aminotransferase. γGT: gamma glutamyltransferase. Tg: triglycerides. Tc: Total cholesterol. HDL: high-density lipoprotein; VLDL: very low-density lipoprotein. LDL: low-density lipoprotein. HOMA: homeostatic model assessments. * with missing data

Table 3. Univariate and multivariate regression analysis of factors associated with VDR- *ApaI* rs7975232, *TaqI* rs731236, *BsmI* rs1544410, *FokI*rs10735810, *GC-* rs4588 and, *GC-* rs7041 SNPs.

SNP	Bivariate analysis <i>P</i> value	Multivariate analysis <i>P</i> (CI)
<i>BsmI</i> rs1544410		
Total Cholesterol mg/dL	0.080	0.524 (0.998 – 1.003)
HOMA	0.019	0.987 (0.887 – 1.125)
Fibrosis Algorithm	0.030	0.040 (0.048 – 0.554)
Genotype 1/ None-1	0.148	0.360 (0.240 – 2.444)
<i>TaqI</i> rs731236		
Total Cholesterol mg/dL	0.045	0.116 (0.999 – 1.005)
Triglycerides mg/dL	0.194	0.033 (0.978 – 0.999)
AST UI/mL	0.184	0.452 (0.994 – 1.013)
Hematocrit %	0.114	0.456 (0.868 – 1.065)
Fibrosis Algorithm	0.164	0.019 (1.320 – 21.746)
<i>ApaI</i> rs7975232		
HOMA	0.018	0.027 (0.171 – 0.900)
Age	0.138	0.087 (0.917 – 1.006)
Gender	0.153	0.125 (0.838 – 4,247)
<i>FokI</i> rs10735810		
LDL mg/dL	0.035	0.106 (0.998 – 1.018)
HDL mg/dL	0.106	0.012 (0.889 – 0.995)
GGT mg/dL	0.115	0.133 (0.979 – 1.003)
Insulin μ U/mL	0.163	0.871 (0.926 – 1.067)
SVR/Without SVR	0.019	0.097 (0.728 – 44.221)
<i>GC</i> rs4588		
Treated/Untreated	0.023	0.679 (0.070 – 59.088)
AST UI/mL	0.082	0.244 (0.989 – 1.047)
Total Cholesterol mg/dL	0.057	0.159 (0.995 – 1.029)
GGT mg/dL	0.014	0.057 (0.999 – 1.056)
Platelets 10^3 /mm	0.059	0.044 (1.000 – 1.034)
<i>GC</i> rs7041		
Fibrosis Algorithm	0.191	0.620 (0.213 – 2.514)
Genotype 1/ Non-1	0.001	0.011 (0.023 – 0.608)
AST UI/mL	0.155	0.757 (0.987 – 1.018)
ALT UI/mL	0.109	0.784 (0.988 – 1.016)
VLDL mg/dL	0.127	0.454 (0.874 – 1.351)
LDL mg/dL	0.115	0.676 (0.997 – 1.002)
HDL mg/dL	0.163	0.763 (0.972 – 1.021)
Triglycerides mg/dL	0.188	0.658 (0.947 – 1.035)
GGT mg/dL	0.084	0.236 (0.998 – 1.010)

Univariate analysis: $p < 0.2$; Multivariate analysis $p < 0.05$. ALT: alanine aminotransferase. AST: aspartate aminotransferase. GGT: gamma glutamyltransferase. HDL: high- density lipoprotein; VLDL: very low- density lipoprotein. LDL: low- density lipoprotein. HOMA: homeostatic model assessments.

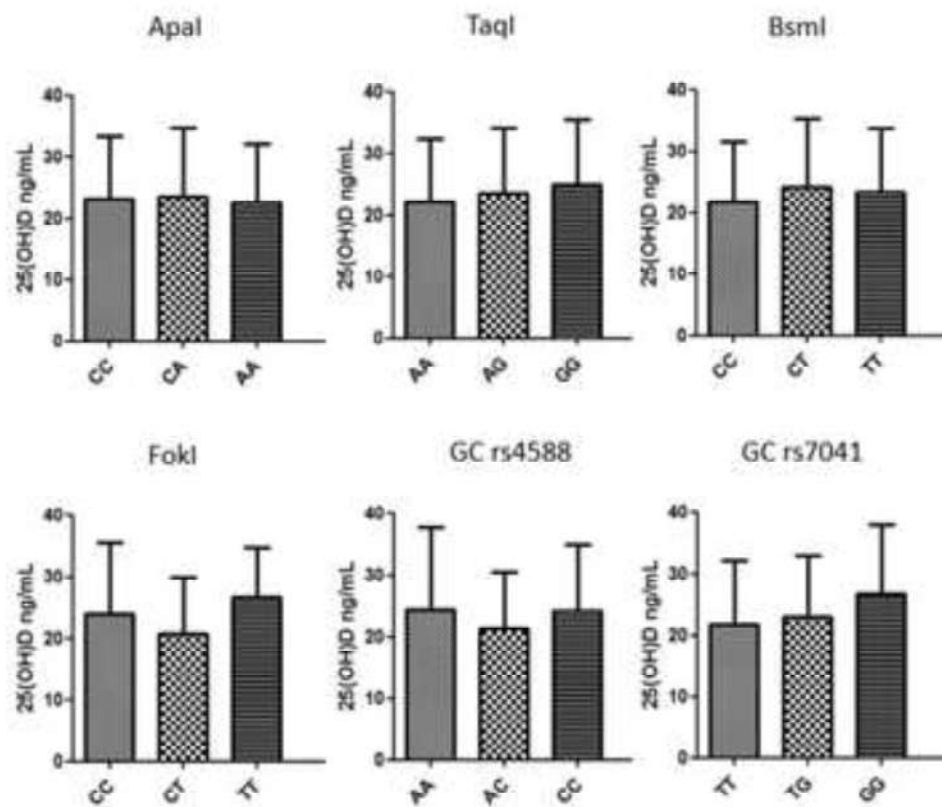


Figure 1. Association of VDR and GC gene polymorphisms with 25(OH)D concentration in Brazilian chronic HCV patients. No significant variance was found using ANOVA test with Bonferroni's correction ($p < 0.05$).

STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No	Recommendation	Page
Title and abstract	1	(a) Indicate the study’s design with a commonly used term in the title or the abstract	2
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	2
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	3 - 4
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	3-4
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	4
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	4
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	4
		(b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case	Not applicable
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	6-7
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	4-6
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	4
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	4
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	6
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	6-7
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	6-7
		(c) Explain how missing data were addressed	6-7
		(d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed <i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	6-7
		(e) Describe any sensitivity analyses	Not applicable

Continued on next page

Results			Page
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	7
		(b) Give reasons for non-participation at each stage	7
		(c) Consider use of a flow diagram	Not applicable
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	7
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	Tables 1 and 2
		(c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)	Not applicable
Outcome data	15*	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time	Not applicable
		<i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure	Not applicable
		<i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures	7-8
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	Tables 2 - 3
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	Tables 2 - 3
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	Not applicable
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	Not done
Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	9
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	11
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	8-11
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	8-11
Other information			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	11

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.

Artigo 4

High prevalence of insulin resistance among brazilian chronic hepatitis C patients

Villar LM, Caldas GC, Scalioni LP*, Miguel JC, Silva EF, Marques VA, VillelaNogueira CA, Lewis-Ximenez LL, Lampe E.

*autor correspondente

Situação de publicação: artigo aceito para publicação na revista Archives of Endocrinology and Metabolism

Qualis: B2

Objetivo do estudo: o objetivo do estudo foi avaliar a prevalência da resistência à insulina e dados demográficos, e laboratoriais em pacientes com hepatite C crônica atendidos em unidades de hepatologia na região sudeste do Brasil.



**HIGH PREVALENCE OF INSULIN RESISTANCE AMONG
BRAZILIAN CHRONIC HEPATITIS C PATIENTS**

Journal:	<i>Archives of Endocrinology and Metabolism</i>
Manuscript ID	AEM-2016-0257.R2
Manuscript Type:	BRIEF REPORT
Date Submitted by the Author:	13-Mar-2017
Complete List of Authors:	Villar, Livia; FIOCRUZ, Viral Hepatitis Laboratory Caldas, Gabriela; Fundacao Oswaldo Cruz Scalioni, Leticia; FIOCRUZ, Viral Hepatitis Laboratory Miguel, Juliana; FIOCRUZ, Viral Hepatitis Laboratory da Silva, Elisangela; FIOCRUZ, Viral Hepatitis Laboratory Marques, Vanessa; FIOCRUZ, Viral Hepatitis Laboratory Villela-Nogueira, Cristiane ; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Clementino Fraga Filho Hospital Lewis-Ximenez, Lia Laura; FIOCRUZ, Viral Hepatitis Laboratory Lampe, Elisabeth; FIOCRUZ, Viral Hepatitis Laboratory
Keyword:	hepatitis C, insulin resistance, prevalence

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 **HIGH PREVALENCE OF INSULIN RESISTANCE AMONG BRAZILIAN CHRONIC HEPATITIS**
2 **C PATIENTS**

3
4 Livia Melo Villar^a, Gabriela Cardoso Caldas^a; Leticia de Paula Scalioni^a; Juliana Custódio Miguel^a;
5 Elisangela Ferreira da Silva^a; Vanessa Alves Marques^a; Cristiane Alves Villela-Nogueira^b, Lia Laura Lewis-
6 Ximenez^a; Elisabeth Lampe^a.

7
8 ^aLaboratory of Viral Hepatitis, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

9 ^bHepatology Unit, Department of Medical Clinic, Clementino Fraga Filho University Hospital, Federal
10 University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

11
12 Correspondence to: Livia Melo Villar, Viral Hepatitis Laboratory, Helio & Peggy Pereira Pavillion, Ground
13 Floor, Room B09, FIOCRUZ Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil Postal Code:
14 210360-040. E-mail: lvillar@ioc.fiocruz.br.

15
16 **Abbreviated title:** High IR prevalence among CHC patients

17 **Keywords:** hepatitis C; insulin resistance; prevalence.

18 **Word count:** 1582

19 **Type of article:** Brief Report

25 **ABSTRACT**

26 Objective: This study aims to estimate the prevalence of insulin resistance (IR) among chronic hepatitis C
27 (CHC) patients and their related laboratory and demographic data. Materials and Methods: In this study, non-
28 diabetic CHC patients referred to Viral Hepatitis Ambulatories from Rio de Janeiro (Brazil) donated blood
29 samples. Insulin was measured using a chemiluminescence immunoassay. IR was determined by HOMA-IR,
30 where HOMA-IR >2 was defined as IR. Results: A total of 214 CHC patients were recruited (123 females
31 aged 53.6 years \pm 10.9 years). IR was present in 133 patients (62.1%) and was associated in bivariate analysis
32 to higher mean values of age ($p=0.040$), triglycerides ($p = 0.032$), glucose ($p = 0.000$), insulin ($p = 0.000$),
33 waist circumference ($p =0.001$), and body mass index ($p = 0.007$); however, none of these variables were
34 significant in the multivariate analysis. Conclusions: The high prevalence of IR was observed among CHC
35 patients, and there was no difference in clinical or laboratory parameters when both groups were compared in
36 the multivariate analysis. This high IR prevalence could lead to a high risk for development of cardiovascular
37 disease and metabolic disorders.

1
2 53 **INTRODUCTION**
3
4

5 54 Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic liver disease, cirrhosis and hepatocellular
6
7 55 carcinoma and is responsible for chronically infecting approximately 130 million people worldwide (1).
8
9 56 HCV morbidity is not limited to the liver but encompasses extrahepatic conditions, including insulin
10
11 57 resistance (IR) and type 2 diabetes mellitus (DM) (2). Chronic infection with HCV is a major risk factor for
12
13 58 the development of insulin resistance and, consequently, for type 2 DM (3). High prevalence of type 2 DM
14
15 59 was documented among chronic HCV cases compared to the general population or to other chronic liver
16
17 60 diseases (2).

18
19 61 Currently, several direct-acting antiviral agents (DAAs) were developed for the treatment of HCV
20
21 62 infection (4), but DAAs are not widely available in low resource areas. In these regions, Peg-IFN and
22
23 63 ribavirin (RBV) are used for antiviral therapy and result in a sustained virological response (SVR) of
24
25 64 approximately 50-80% according to the HCV genotype (5). Low rates of SVR for double therapy are
26
27 65 observed in the presence of IR or type 2 diabetes using double therapy (6,7).

28
29 66 Some studies showed that more than 50% of HCV infected individuals have IR (8,9). In Brazil, IR
30
31 67 prevalence varies from 20 to 80% in HCV patients (9-13). IR was also associated with age, waist
32
33 68 circumference, body mass index (BMI), advanced liver fibrosis (10), HCV viral load (14), higher mean
34
35 69 degree of steatosis (15) and higher serum levels of oxidative stress (10,11). Although some studies have
36
37 70 reported IR prevalence among HCV individuals, the number of subjects is relatively small, and only one or
38
39 71 two HCV genotypes were included. In addition, the relationship among IR and biochemical, haematological,
40
41 72 and virological data is unclear. The present study was conducted to determine the prevalence of IR and
42
43 73 related demographic and laboratory data among chronic HCV patients referred to hepatology units from
44
45 74 Southeast Brazil.
46
47

48 75

49
50 76 **MATERIALS AND METHODS**
51

52
53 77 *Study Population*
54
55
56
57
58
59
60

1
2 78 A total of 214 consecutive chronic HCV (CHC) patients referred to Viral Hepatitis Ambulatory
3
4 79 (FIOCRUZ) and Hepatology Unit (Clementino Fraga Filho University Hospital, UFRJ) were recruited from
5
6 80 January 2012 to November 2012 and were included in this study.
7
8

9 81 The inclusion criteria were individuals of any gender or ethnicity who were more than 18-years-old,
10 82 presented with reactive serum for anti-HCV/HCV RNA for more than 6 months and agreed to participate in
11 83 the study after reading and signing the informed consent. The exclusion criteria were the presence of
12 84 decompensated liver disease (ascites, bleeding from ruptured varices, or encephalopathy), other causes of
13 85 liver disease (hepatitis B), severe psychiatric disorders, pregnancy or breastfeeding, pancreatitis, the presence
14 86 of type 2 diabetes mellitus defined as a fasting plasma glucose concentration ≥ 126 mg/dL in two
15 87 measurements prior to inclusion in the study or previous antiviral treatment. All patients were negative for
16 88 hepatitis B surface antigen and anti-human immunodeficiency virus.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29 90 *Anthropometric and laboratory evaluations*

30
31
32 91 Body mass index (BMI) was calculated as weight divided by the square of the height (kg/m^2). Waist
33 92 circumference was measured to the nearest 0.5 cm at the shortest point below the lower rib margin and the
34 93 iliac crest. Trained staff took these measurements.
35
36
37

38 94 Fasting blood samples were obtained for measurement of aminotransferases (alanine
39 95 aminotransferase, aspartate aminotransferase), alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase, glucose,
40 96 total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol (HDL cholesterol), very low density lipoproteins
41 97 (VLDL), low density lipoproteins (LDL) cholesterol, triglycerides, haemoglobin, haematocrit, neutrophil and
42 98 platelet counts, and thyroid stimulating hormone (TSH).
43
44
45
46
47
48

49 99 Serum insulin levels were determined by a chemo-illuminescence immunoassay (Liaison Insulin,
50 100 Diasorin, Pomezia, Italy) using an autoanalyser. The HOMA-IR score was calculated using the following
51 101 equation: $\text{HOMA-IR} = \text{fasting insulin} \times \text{fasting glucose} \times 0.056 / 22.5$. A HOMA-IR higher than 2.0 was
52 102 considered insulin resistance (7,15). Fibrosis grade was assessed using aminotransferase (AST) to platelet
53 103 ratio index (APRI), and an index above 2 indicated the presence of advanced fibrosis (16).
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

104

Virological Assays

All patients had positive anti-HCV as measured using EIA (HCV Ab, Radim, Italy) and positive HCV RNA in serum. HCV RNA was detected and quantified using Cobas Taqman HCV (Roche Diagnostics, France), and HCV RNA reactive samples were submitted to the genotype using INNOLIPA HCV II (Innogenetics, Zwijndrecht, Belgium).

110

Data analysis

Continuous variables were summarized as the mean \pm standard deviation (SD) and categorical variables were described as frequencies and percentages. Comparisons between groups were made by using the Student's *t* test or the Mann-Whitney *U* test for continuous variables and the Chi-square test or Fisher's exact probability test for categorical data. Two-sided P-values 0.05 were considered statistically significant.

Bivariate analysis was done using HOMA-IR as the dependent dichotomous variable (≤ 2 or >2).

Variables significantly associated with IR in the bivariate analysis ($p < 0.05$) were included in the stepwise multivariate logistic regression model. All data were entered and analysed in SPSS version 20.0.

119

Ethical Considerations

This study was conducted according to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. The protocol and consent form were approved by the Ethics Committee of FIOCRUZ. All individuals gave their informed consent and answered a questionnaire giving information regarding risk behaviour and sociodemographic data (age, gender).

125

RESULTS**Patients' characteristics**

1
2 128 Table 1 shows the baseline features of the 214 CHC patients included in this study. There were 123
3
4 129 females (57.6%) and their mean age was 53.7 ± 10.9 years. The mean waist circumference was 93.3 cm
5
6 130 (± 11.8) and the mean BMI was 27.5 kg/m^2 (± 4.2). The mean HOMA-IR score was 3.4 (3.5) and a HOMA-
7
8 131 IR level higher than 2 was found in 133 patients (62.1%). A total of 46 individuals (21.5%) were classified
9
10 132 with an advanced grade of fibrosis using the APRI index. HCV genotype was determined among 167
11
12 133 individuals, 145 of them presented with genotype 1 (86.8%) followed by genotypes 3 (9.6%), 2 (2.4%), and
13
14 134 5 (1.2%). After inclusion in the study, 39 individuals underwent therapy with PEG interferon/ribavirin, 16
15
16 135 (41.0%) of whom achieved SVR. The mean values of ALT, AST, and GGT were above the normal values.
17
18 136

21 137 *Baseline HOMA-IR and demographic and laboratory data*

24 138 When IR was evaluated according to the demographic and laboratory data (Table 1), significant
25
26 139 differences were found between the two groups according to age ($p = 0.040$), waist circumference ($p = 0.001$),
27
28 140 BMI ($p = 0.007$), glucose ($p = 0.000$), triglycerides ($p = 0.032$) and insulin ($p = 0.000$) in the bivariate analysis.
29
30 141 Variables included in the multivariate analysis model were age, waist circumference, BMI, and triglycerides;
31
32 142 none of these variables was significantly associated with HOMA-IR. Most individuals with IR had higher
33
34 143 mean values of GGT and HCV viral load, but this was not statistically significant.
35
36

40 145 **DISCUSSION**

43 146 HCV infection has been related to extra-hepatic manifestations, such as diabetes and IR. The present study
44
45 147 demonstrated a high prevalence of IR (62.1%) compared to previous studies conducted in Europe (42 - 46%)
46
47 148 (7, 17), North America (40%) (18), Asia (51%) (8) and Brazil (53%) (9). **Recently, IR prevalence in the**
48
49 149 **Brazilian Longitudinal Study of Adult Health was found to vary from 12 to 22%, a rate that is lower than that**
50
51 150 **found in the present study (19). The high prevalence of IR found in the present study could be** the result of the
52
53 151 large number of HCV individuals who were included. Since the role of insulin resistance and hyperglycaemia
54
55 152 as predictors of SVR with DAA HCV treatment has not been clearly established, the high prevalence of IR
56
57 153 observed in the present study could have an impact in SVR with DAA treatment.
58
59
60

1
2 154 In the bivariate analysis, IR was associated with age and anthropometric factors (BMI, waist
3
4 155 circumference); however, **this association was not found in the multivariate analysis**. Some studies also
5
6 156 showed the association of age, waist circumference, and BMI to IR among HCV patients (9,10,11,13,18). IR
7
8 157 was also associated with higher mean values of triglycerides and is most likely the result of the
9
10 158 characteristics of the HCV replication cycle. The HCV life cycle is associated with cholesterol and
11
12 159 lipogenesis pathways in hepatocytes causing enhanced lipogenesis, impaired degradation and impaired
13
14 160 export (20).

161 Some biochemical parameters, such as ALT, AST and, GGT were above the normal values, most
162 likely as a result of chronic liver inflammation. Miyajima et al.(16) also showed higher mean values of
163 glucose, ALT, AST and GGT among HCV chronic patients compared to non-infected individuals from
164 Japan.

165 In the present work, HOMA was not associated with HCV viral load, genotype or SVR. Although
166 some studies have shown an improvement in HOMA values among HCV patients presenting with SVR (7)
167 and a high viral load among those presenting with IR (14), other studies have not found any such association
168 (17, 21). This lack of association could be the result of the low prevalence of SVR, high viral load and
169 predominance of genotype 1 in the present cohort. One limitation of this study is the low number of non-1
170 HCV genotypes; other studies that evaluated HOMA-IR in HCV patients also included 75 to 80% of HCV
171 genotype 1 (9,14).

172 IR was not associated with fibrosis grade as was observed in studies conducted in HCV patients from
173 Northeast and South regions of Brazil (9,14); this could be because of the small number of patients with an
174 advanced grade of fibrosis that was included in these studies.

175 In conclusion, a high prevalence of insulin resistance was observed among HCV patients,
176 demonstrating that this population may be at increased risk for developing type 2 diabetes mellitus. In the
177 bivariate analysis, IR was associated with demographic (age), anthropometric (BMI and waist
178 circumference) and laboratory (glucose, insulin and triglycerides) parameters. Although these variables were
179 not significant in the multivariate analysis, these data suggest a high risk for development of cardiovascular
180 disease and metabolic disorders among HCV patients.

181
182

183 **Table 1 - Demographic and laboratory data among Brazilian HCV patients according to insulin**
 184 **resistance (IR) status. Legend: ^aMean±SD; ^bMedian, minimum and maximum; NI: not included.**

Variable	All patients	Without IR	With IR	Bivariate analysis	Multivariate Analysis
		N=81	N=133	P value	Odds Ratio (IC 95%)
		55.64±10.40	52.47±11.16	0.040	0.957 (0.912 – 1.005)
Age (years) ^a	53.7±10.9				0.080
Gender (Female/Male)	123/91	47/34	76/57	0.899	NI
Waist Circumference (cm) ^a	93.30±11.80	87.96±11.29	95.80±11.24	0.001	1.053 (0.996 – 1.114)
BMI (kg/m ²) ^a	27.50± 4.20	25.90±3.80	28.30±4.20	0.007	1.046 (0.896 – 1.222)
Glucose (mg/dL) ^b	90.00 (32.00 – 355.00)	87.00 (32.00 – 24.00)	92.5 (60.00 – 355.00)	0.000	NI
VLDL (mg/dL) ^b	18.00 (7.00 – 115.00)	16.30 (7.00 – 46.80)	19.80 (40.00 – 115.00)	0.059	NI
LDL (mg/dL) ^b	103.00 (14.00 – 1077.00)	97.85 (35.00 – 1077.00)	107.00 (14.00 – 996.00)	0.154	NI
Triglycerides (mg/dL) ^b	90.00 (34.00 – 573.00)	82.00 (34.00 – 273.00)	99 (40.00 – 573.00)	0.032	1.010 (0.998 – 1.021) 0.102
Total Cholesterol (mg/dL) ^b	173.00 (74.00 – 1169.00)	165.50 (100.00 – 1169.00)	177.00 (74.00 – 1069.00)	0.099	NI
HDL (mg/dL) ^b	49.60 (3.00 – 130.00)	49.30 (4.00 – 130.00)	49.80 (3.00 – 120.00)	0.844	NI
Insulin (μU/mL) ^b	11.60 (2.00 – 75.00)	6.00 (1.70 – 12.60)	14.70 (6.00 – 75.00)	0.000	NI
ALT (U/L) ^b	52.00 (0.00 – 297.00)	56.00 (12.00 – 269.00)	51.00 (0.00 – 297.00)	0.350	NI
AST (U/L) ^b	62.00 (10.00 – 325.00)	69.50 (21.30 – 244.00)	61.00 (10.40 – 325.00)	0.274	NI
GGT (U/L) ^b	66.15 (10.00 – 1142.00)	73.00 (10.00 – 343.00)	63.00 (14.00 – 1142.00)	0.399	NI
Alkaline phosphatase ^b	115.00 (6.00 – 95.00)	114.00 (6.00 – 501.00)	117.00 (10.00 – 695.00)	0.538	NI
TSH (mIU/L) ^b	1.70 (0.07 – 91.40)	1.62 (0.37 – 77.70)	1.75 (0.07 – 91.40)	0.360	NI

1						
2	Haemoglobin^a	13.90±1.50	13.84±1.39	13.96±1.53	0.574	NI
3						
4	Haematocrit^a	41.60±4.50	41.25±3.57	41.92±4.95	0.297	NI
5						
6	Platelet (x 10³/mm³)^a	188.80±80.10	179.52±78.52	194.54±80.85	0.185	NI
7						
8	HCV RNA (UI/mL)^b	9.80 x 10 ⁴	6.00 x 10 ⁴	2.70 x 10 ⁵	0.108	NI
9		(25 – 1.00 x 10 ⁹)	(25 – 3.00 x 10 ⁷)	(28 – 1.00 x 10 ⁹)		
10	Fibrosis Grade				0.703	NI
11						
12	Low (APRI < 2), n (%)	168 (78.50)	62 (76.54)	106 (79.70)		
13	Advanced (APRI > 2), n					
14	(%)	46 (21.50)	19 (23.45)	27 (20.30)		

185

186

187 Acknowledgements

188 The authors would like to thank the health personnel of the Viral Hepatitis Laboratory for their help in
 189 collecting and processing blood samples.

190

191 Funding Statement

192 This research was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ),
 193 Brazilian National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) and the Oswaldo Cruz
 194 Foundation (FIOCRUZ).

195

196 Competing Interests

197 Authors have no relevant conflicts of interest to disclose.

198

199 REFERENCES

200

- 201 1. World Health Organization. Hepatitis C. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en>.
 202 Accessed 31 July 2016.

- 1
2 203 2. Knobler H, Malnick S. Hepatitis C and insulin action: An intimate relationship. *World J Hepatol.*
- 3
4 204 2016;8(2):131-8.
- 5
6 205 3. Das GC, Hollinger FB. Molecular pathways for glucose homeostasis, insulin signaling and
- 7
8 206 autophagy in hepatitis C virus induced insulin resistance in a cellular model. *Virology* 2012; 434
- 9
10 207 (1):5-17.
- 11
12 208 4. Zhang X. Direct anti-HCV agents. *Acta Pharm Sin B.* 2016;6(1):26-31.
- 13
14 209 5. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB; American Association for the Study of Liver
- 15
16 210 Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology.*
- 17
18 211 2009;49(4):1335-74.
- 19
20 212 6. Laurito MP, Parise ER. Association between insulin resistance and sustained virologic response in
- 21
22 213 hepatitis C treatment, genotypes 1 versus 2 and 3: systematic literature review and meta-analysis.
- 23
24 214 *Braz J Infect Dis.* 2013;17(5):555-63.
- 25
26 215 7. Del Campo JA, Ampuero J, Rojas L, Conde M, Rojas A, Maraver M, et al. Insulin resistance
- 27
28 216 predicts sustained virological response to treatment of chronic hepatitis C independently of the
- 29
30 217 IL28b rs12979860 polymorphism. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 37:74-80.
- 31
32 218 8. Kiran Z, Zuberi BF, Anis D, Qadeer R, Hassan K, Afsar S. Insulin resistance in non-diabetic
- 33
34 219 patients of chronic Hepatitis C. *Pak J Med Sci.* 2013;29(1):201-4.
- 35
36 220 9. Mello V, Cruz T, Nuñez G, Simões MT, Ney-Oliveira F, Braga H, et al. Peripheral insulin
- 37
38 221 resistance during treatment of chronic hepatitis C with peguilated interferon plus ribavirin. *J Med*
- 39
40 222 *Virolog* 2006; 78 (11):1406-10.
- 41
42 223 10. Oliveira AC, Parise ER, Catarino RM, Lanzoni V, Leite-Mor MM, Simon KA, et al. Insulin
- 43
44 224 resistance and not steatosis is associated with modifications in oxidative stress markers in chronic
- 45
46 225 hepatitis C, non-3 genotype. *Free Radic Res* 2009; 43 (12):1187-94.
- 47
48 226 11. Souza AFM, Pace FHL, Chebli JMF, Ferreira LE. Insulin resistance in non-diabetic patients with
- 49
50 227 chronic hepatitis C: what does it mean? *Arq Bras Endocrinol Metab* 2011; 55 (6):412-418.
- 51
52 228 12. Oliveira LP, Jesus RP, Boulhosa RS, Mendes CM, Lyra AC, Lyra LG. Metabolic syndrome in
- 53
54 229 patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection who do not have obesity or type 2
- 55
56 230 diabetes. *Clinics (Sao Paulo)* 2012; 67 (3):219-23
- 57
58
59
60

- 1
2 231 13. Oliveira LP, de Jesus RP, Boulhosa RS, Onofre T, Mendes CM, Vinhas L, et al. Factors
3
4 232 Associated with Insulin Resistance in Patients with Chronic HCV Genotype 1 Infection without
5
6 233 Obesity or Type 2 Diabetes. *J Am Coll Nutr.* 2016;35(5):436-42.
7
8 234 14. Michalczuk MT, Kappel CR, Birkhan O, Bragança AC, Alvares-da-Silva MR. HOMA-AD in
9
10 235 Assessing Insulin Resistance in Lean Noncirrhotic HCV Outpatients. *Int J Hepatol.*
11
12 236 2012;2012:576584.
13
14 237 15. Péres DP, Cheinquer H, Wolf FH, Cheinquer N, Falavigna M, Péres LD. Prevalence of insulin
15
16 238 resistance in chronic hepatitis C genotype 1 and 3 patients. *Ann Hepatol* 2013; 12 (6):871-5.
17
18 239 16. Miyajima I, Kawaguchi T, Fukami A, Nagao Y, Adachi H, Sasaki S, et al. Chronic HCV infection
19
20 240 was associated with severe insulin resistance and mild atherosclerosis: a population-based study in
21
22 241 an HCV hyperendemic area. *J Gastroenterol* 2013; 48 (1):93-100.
23
24 242 17. Serfaty L, Fornis X, Goeser T, Ferenci P, Nevens F, Carosi G, et al. Insulin resistance and response
25
26 243 to telaprevir plus peginterferon α and ribavirin in treatment-naive patients infected with HCV
27
28 244 genotype 1. *Gut* 2012; 61 (10):1473-80.
29
30 245 18. Ramcharran D, Wahed AS, Conjeevaram HS, Evans RW, Wang T, Belle SH, et al. Associations
31
32 246 between serum lipids and hepatitis C antiviral treatment efficacy. *Hepatology* 2010; 52 (3):854-863.
33
34 247 19. Benseñor IM, Goulart AC, Molina Mdel C, de Miranda ÉJ, Santos IS, Lotufo PA. Thyrotropin
35
36 248 Levels, Insulin Resistance, and Metabolic Syndrome: A Cross-Sectional Analysis in the Brazilian
37
38 249 Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *Metab Syndr Relat Disord.* 2015 Oct;13(8):362-
39
40 250 9.
41
42 251 20. Chang ML. Metabolic alterations and hepatitis C: From bench to bedside. *World J Gastroenterol.*
43
44 252 2016;22(4):1461-76.
45
46 253 21. Fattovich G, Covolo L, Pasino M, Perini E, Rossi L, Brocco G, et al. The homeostasis model
47
48 254 assessment of the insulin resistance score is not predictive of a sustained virological response in
49
50 255 chronic hepatitis C patients. *Liver Int* 2011; 31 (1):66-74.
51
52 256
53
54
55
56
57
58
59
60

Artigo 5

Lack of Association between Hepatitis C Virus core Gene Variation 70/91aa and Insulin Resistance

Scalioni LP, Peres-da-Silva A, Miguel JC, Espírito-Santo MP, Marques VA, Brandão-Mello CE, Villela-Nogueira CA, Lewis-Ximenez LL, Lampe E, Villar LM
*autor correspondente

Situação de publicação: artigo publicado em Int J Mol Sci. 2017 Jul 21;18(7).PMID: 28753979

Qualis: A2

Objetivo do estudo: o objetivo deste estudo foi determinar o impacto das substituições dos aminoácidos (aa) do core do HCV nas posições 70 e 91 de acordo com a resistência insulínica e também, identificar associações clínicas e laboratoriais.



Article

Lack of Association between Hepatitis C Virus *core* Gene Variation 70/91aa and Insulin Resistance

Letícia de Paula Scalioni ¹, Allan Peres da Silva ¹, Juliana Custódio Miguel ¹,
Márcia Paschoal do Espírito Santo ¹, Vanessa Alves Marques ¹, Carlos Eduardo Brandão-Mello ²,
Cristiane Alves Villela-Nogueira ³, Lia Laura Lewis-Ximenez ¹, Elisabeth Lampe ¹
and Livia Melo Villar ^{1,*}

- ¹ Livia Melo Villar, Viral Hepatitis Laboratory, Helio and Peggy Pereira Pavilion, Ground Floor, Room B09, FIOCRUZ Av. Brasil, 4365-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 210360-040, Brazil; le_scali@hotmail.com (L.d.P.S.); allan@ioc.fiocruz.br (A.P.d.S.); julicm@ioc.fiocruz.br (J.C.M.); paschoalms@gmail.com (M.P.d.E.S.); vmarques@ioc.fiocruz.br (V.A.M.); llewis@ioc.fiocruz.br (L.L.L.-X.); elampe@ioc.fiocruz.br (E.L.)
- ² Gaffrée & Guinle University Hospital, Federal University of Rio de Janeiro State, Rio de Janeiro, RJ 20270-001, Brazil; cedubrandao@gmail.com
- ³ University Hospital Clementino Fraga Filho, School of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-913, Brazil; crisvillelanog@gmail.com
- * Correspondence: liviafiocruz@gmail.com or lvillar@ioc.fiocruz.br

Academic Editor: Tatsuo Kanda

Received: 31 March 2017; Accepted: 24 May 2017; Published: 21 July 2017

Abstract: The role of hepatitis C virus (HCV) in insulin resistance (IR) is not fully understood. The aim of this study was to determine the impact of amino acid (aa) substitutions in the *core* region of HCV according to IR and to identify clinical and laboratory associations. Ninety-two treatment-naïve HCV patients were recruited to determine laboratory data and blood cell count. IR was determined using Homeostasis Model Assessment (HOMA) index where IR was defined as $HOMA \geq 2$. HCV RNA load and genotype were determined by Abbott Real time HCV. HCV *core* region was determined by direct nucleotide sequencing. Bivariate analysis was conducted using $HOMA IR \geq 2$ as a dependent factor. IR prevalence was 43.5% ($n = 40$), vitamin D sufficiency was found in 76.1% ($n = 70$) and 72.8% ($n = 67$) had advanced liver fibrosis. In the bivariate analyses, elevated values of γ GT ($p = 0.024$) and fibrosis staging ($p = 0.004$) were associated with IR, but IR was not related to core mutations. The presence of glutamine in position 70 was associated with low vitamin D concentration ($p = 0.005$). In the multivariate analysis, no variable was independently associated with HOMA-IR. In conclusion, lack of association between IR and HCV core mutations in positions 70 and 91 suggests that genetic variability of this region has little impact on IR.

Keywords: amino acid; core mutation; insulin resistance; hepatitis C

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is a serious health problem affecting over 170 million people worldwide [1]. Chronic hepatitis C (CHC) is associated with many extrahepatic manifestations that contribute to morbidity and mortality [2].

CHC when associated with metabolic diseases may lead to rapid progression of the disease, increasing the risk of developing hepatocellular carcinoma (HCC) and advanced fibrosis [3]. These data become extremely relevant due to the high prevalence of obesity and metabolic syndromes observed worldwide [3].

Further studies are needed to address the various metabolic manifestations possible in patients with CHC. Currently available antiviral treatment for HCV has been shown to be quite effective (>90%), but it is important to recognize and identify irreversible and associated metabolic damage, thereby reducing the morbidity and mortality associated with HCV [3].

Some studies have shown that CHC is associated with insulin resistance (IR) and DM2 (diabetes mellitus type 2) [4,5], which is characterized by hyperinsulinemia in patients with normal fasting blood glucose and with an increased risk of developing diabetes mellitus (T2DM), heart disease, and nonalcoholic fatty liver disease [6,7].

Hepatitis C virus promotes the development of IR and DM2 by increasing the inflammatory response, such as high production of interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF), and oxidative stress, leading to interference in the insulin signaling pathway in hepatocytes [8].

Previous studies provided a direct experimental evidence for the contribution of HCV core protein in the development of insulin resistance (IR), but the clinical impact of HCV core region on IR is still not clear [8,9]. Akuta et al. [9] demonstrated that patients infected with HCV genotype 1b and who had 70Q core mutation had higher rates of IR than patients with HCV genotype 1b without the mutation, indicating that this mutation is associated with the development of IR. In addition, it has been suggested that core 70Q mutation is associated with a higher incidence of HCC and mutations in 70 and/or 91 positions are important predictors of IR in patients without cirrhosis or DM [10,11].

Despite this evidence, there are few studies on the genomic variability of the HCV 70/91 aa relating to the development of IR [8–10]. The aim of this study is to determine the impact of aa substitutions in the *core* region of HCV with insulin resistance and to identify associations with clinical and laboratory data.

2. Results

2.1. Clinical Characteristics

The baseline characteristics of 92 patients with CHC are shown in Table 1. There were 55 women and 37 men, with a mean age of 54.84 (± 10.88) years. Elevated mean values of ALT (73.51 ± 58.76 IU/mL), AST (72.15 ± 44.04 IU/mL), alkaline phosphatase (136.21 ± 75.66 IU/mL), and γ GT (94.25 ± 77.66 IU/mL) were observed in patients. HOMA index mean was also higher than the cutoff established in this study (3.08 ± 2.74), where 43.5% ($n = 40$) presented IR. Lipids mean values were classified as normal as well as blood glucose value (92.84 ± 13.51 ng/mL), platelets ($187.13 \pm 72.72 \times 10^3/\text{mm}^3$), and hemoglobin (14.04 ± 1.27 ng/mL) (anemic classification: hemoglobin values <12 ng/mL for women and <13 ng/mL for men). Using the cutoff value of 20 ng/mL for hypovitaminosis, most individuals had adequate vitamin D concentrations (76.1%, $n = 70$). Genotype 1b was the most prevalent 64.1% ($n = 59$), followed by genotype 1a, 25% ($n = 23$) and genotype 3, 10.9% ($n = 10$). HCV RNA log median was high, 5.81 UI/mL (1.86–7.49). After inclusion in the study, most individuals were not treated (56.5%) while 40 individuals were treated after of which half of them achieved sustained viral response (SVR). Using fibrosis algorithm, 72.8% ($n = 67$) presented advanced fibrosis.

Table 1. Demographic, laboratory, and metabolic data of 92 CHC.

Variable	Value
Age (years)	54.84 (± 10.88)
Gender	
Female	55 (59.8%)
Male	37 (40.2%)
25(OH)D ng/mL	27.82 (± 12.29)
HCV RNA IU/mL	6.51×10^6 (7.2×10^1 – 3.06×10^8)
Log ₁₀ HCV RNA IU/mL	5.81 (1.86–7.49)
Blood pressure	99.03 (± 18.52)
Glucose ng/mL	92.84 (± 13.51)
AST IU/mL	72.15 (± 44.04)
ALT IU/mL	73.51 (± 58.76)
VLDL mg/dL	18.96 (± 7.80)
LDL mg/dL	105.500 (98–1069)
γ GT IU/mL	94.25 (± 77.66)
Insulin μ U/mL	13.43 (± 12.28)
HOMA	3.08 (± 2.74)
TSH mIU/L	1.63 (0.07–11.49)
Hemoglobin g/dL	14.04 (± 1.27)
Hematócrit (%)	41.65 (± 3.60)
Phosphatase IU/mL	136.21 (± 75.66)
Platelets 10^3 /mm	187.13 (± 72.72)
Sustained virological response (SVR)	
Without SVR	20 (21.7%)
With SVR	20 (21.7%)
No treatment	52 (56.5%)
Genotype	
1a	23 (25%)
1b	59 (64.1%)
3	10 (10.9%)
25(OH)D *	
<20	21 (22.8%)
≥ 20	70 (76.1%)
Homeostatic model assessment(HOMA)	
<2	52 (56.5%)
≥ 2	40 (43.5%)
Fibrosis algorithm	
Low	25 (54.3%)
High	67 (72.8%)

Continuous variables are expressed as mean value \pm standard deviation. Percentage in parenthesis referred to the total of 92 patients. ALT: alanine aminotransferase. AST: aspartate aminotransferase. γ GT: γ glutamyltransferase. LDL: low-density lipoprotein. * missing data: one patient.

2.2. Insulin Resistance and Associated Factors

To assess the influence of IR on HCV infection, comparative analysis of demographic and clinical variables was evaluated according to previously defined IR cutoff values ($\text{HOMA} \geq 2$). Elevated values of γ GT ($p = 0.024$) and advanced fibrosis ($p = 0.004$) were both associated with $\text{HOMA} \geq 2$ in CHC patients in the univariate analysis (Table 2), but associations were lost when using the multivariate analysis. We made an analysis using $\text{HOMA} > 3.0$ and 3.5 , but no variable was statistically significant.

Table 2. Univariate and multivariate regression analysis of factors associated with Insulin Resistance in 92 CHC patients.

Variable	Homeostatic Model Assessment (HOMA)		Bivariate Analysis <i>p</i> Value	Multivariate Analysis <i>p</i> (CI)
	<2	≥2		
Age (years)	52.42 (±11.49)	56.71 (±10.13)	0.061	—
Gender				
Female	32 (61.54%)	23 (57.5%)	0.695	—
Male	20 (38.46%)	17 (42.5%)		
25(OH)D ng/mL	28.43 (±10.92)	27.35 (±13.35)	0.681	—
HCV RNA IU/mL	6.51×10^6 (7.2×10^1 – 1.3×10^7)	2.13×10^6 (1.34×10^2 – 3.06×10^7)	0.335	—
Log ₁₀ HCV RNA IU/mL	5.52 (±1.32)	5.26 (±1.47)	0.335	—
Glucose ng/mL	93.26 (±12.96)	92.61 (±14.04)	0.820	—
AST IU/mL	62.69 (±40.05)	79.43 (±45.93)	0.033	0.358 (0.989–1.030)
ALT IU/mL	71.02 (±57.35)	75.42 (±60.32)	0.795	—
VLDL mg/dL	19.33 (±8.85)	18.69 (±6.98)	0.785	—
LDL mg/dL	111.62 (28.7–996)	104.75 (40–155.40)	0.024	0.509 (0.975–1.013)
γGT IU/mL	78.44 (±71.07)	106.42 (±77.49)	0.024	0.217 (0.997–1.014)
TSH mIU/L	2.25 (±1.83)	1.86 (±1.55)	0.194	—
Hemoglobin g/dL	13.79 (±1.38)	14.23 (±1.16)	0.101	—
Hematocrit (%)	41.53 (±4.05)	41.75 (±3.26)	0.767	—
Phosphatase IU/mL	136.40 (±90.64)	136.07 (±77.17)	0.985	—
Platelets 10 ³ /mm	195.03 (±78.06)	181.07 (±68.48)	0.365	—
Sustained virological response (SVR)				
Without SVR	7 (17.5%)	13 (25%)		—
With SVR	8 (20%)	12 (23.08)	0.568	—
No treatment	25 (62.50%)	27 (51.92)		
Genotype				
1a	9 (22.5%)	14 (26.92%)		—
1b	27 (67.5%)	32 (61.54%)	0.839	—
3	4 (10%)	6 (11.54%)		
25(OH)D *				
<20	7 (17.50%)	14 (27.45%)		—
≥20	33 (82.5%)	37 (72.55%)	0.263	—
Fibrosis algori thm				
Low	17 (42.5%)	8 (15.38%)		0.065 (0.106–1.070)
High	23 (57.50%)	44 (84.62%)	0.004	

Continuous variables were expressed as mean value ± standard deviation. Percentage in parenthesis referred to the total of 92 patients. ALT: alanine aminotransferase. AST: aspartate aminotransferase. γGT: γ glutamyltransferase. LDL: low-density lipoprotein. HOMA: homeostatic model assessments. * missing data: one patient.

2.3. Substitution of Hepatitis C core Amino Acids 70 and 91 versus Insulin Resistance Development and Laboratorial Data

IR was evaluated regarding the presence or absence of mutations at *core* positions 70 and 91. In this study, R70Q (Q = 26; H = 2) and M91L/C (L = 12; C = 2) *core* substitutions were present exclusively in HCV genotype 1b; while genotype 1a had R70W/P/Q (W = 1; P = 1; Q = 1) and cysteine in all sequences at position 91 and genotype 3, the mutations P70Q/R (Q = 4; R = 10) and C91L ($n = 1$). A total of 92 subjects were studied, where 52 presented insulin resistance with HOMA-IR ≥ 2 . There was no statistical association between the presence of IR and mutations in the *core* region (Table 3). Analysis using HOMA >3.0 and 3.5 was carried out, but no variable was statistically significant (data not shown).

Besides, all mutations were analyzed as dependent variables in a univariate model with biochemical, virological, and demographic data (data not shown). The presence of amino acid glutamine (Q) in position 70, was associated with lower 25(OH)D concentration ($p = 0.005$) (CI: 0.09091–0.4789). When protein sequences were evaluated in VESPA software, no variable position (signature) was found in the presence of IR. A boxplot was designed for each genotype and mutation core aa 70 according to HOMA values. Median HOMA values were higher in genotype 3a samples with any mutation in position 70 (Figure 1).

Table 3. Evaluation of insulin resistance defined by HOMA index according genetic variability of HCV core gene (aa 70 and 91) in 92 patients with CHC.

Variable	Total N (%)	HOMA <2	≥ 2	Bivariate Analysis <i>p</i> Value
Any mutation in 70aa				
Wild type	50 (54.3%)	23 (57.5%)	27 (51.92%)	0.594
Mutant	42 (45.7%)	17 (42.5%)	25 (48.08%)	
70Q				0.783
Wild type	63 (68.5%)	28 (70%)	35 (67.31%)	
Mutant	29 (31.5%)	12 (30%)	17 (32.69%)	
70R				0.518
Wild type	83 (90.2%)	37 (92.50%)	46 (88.46%)	
Mutant	9 (9.8%)	3 (7.50%)	6 (11.54%)	
Any mutation in 91aa				0.959
Wild type	78 (84.8%)	34 (85%)	44 (84.62%)	
Mutant	14 (15.2%)	6 (15%)	8 (15.38%)	
Any mutation in 70 and 91aa				0.276
Wild type	87 (94.6%)	39 (97.5%)	48 (92.31%)	
Mutant	5 (5.4%)	1 (2.50%)	4 (7.69%)	

aa: amino acid. Genotype 3 wild type in aa 70 according reference sequence D49374.1 is P (proline). Genotype 1, subtypes 1a and 1b, in aa 70 according reference sequence NC_004102 and D90208, respectively, R (arginine). Genotype 3 wild type in aa91 according reference sequence D49374.1 is C (cysteine). Genotype 1, subtypes 1a and 1b, in aa91 according reference sequence NC_004102 and D90208, respectively, C (cysteine) and M (methionine).

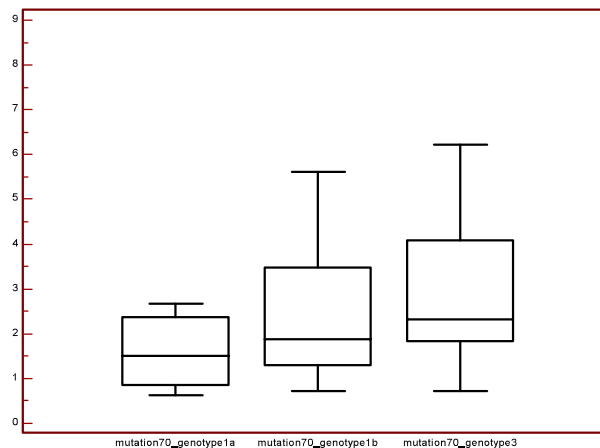


Figure 1. Boxplots for each genotype and mutation 70 according to HOMA values for each patient. Mutation70_genotype1a: Median, 1.501; Minimum, 0.6321; Maximum, 2.669. Mutation70_genotype1b: Median, 1.881; Minimum, 0.7246; Maximum, 6.793. Mutation70_genotype3: Median, 2.312; Minimum, 0.7104; Maximum, 8.880.

3. Discussion

The present study did not identify an association between insulin resistance and core amino acid 70 and 91 substitutions. Conversely, *core* mutations R70Q and M91L/C had been previously reported to be associated with IR in genotype 1b [9]. In addition, these mutations had been related to: increased HCC risk, [12,13], non-virological response to interferon-based therapy in Japanese patients [10], variable responses to double (IFN/RBV) [14,15], and triple therapy (telaprevir plus INF/RBV) [16,17], and liver steatosis [18]. On the other hand, some studies showed that HCV core protein increases IRS-1 phosphorylation, modulates Forkhead box transcriptional regulators (FoxO1 and FoxO2), and activates the mTOR/S6K1 pathway that could contribute to promote IR. These data show that HCV core protein have an important role in developing IR even in the absence of core mutations [19–21].

The lack of association of these mutations in the present study could be due to the prevalence of obese patients in Brazil compared to Japan that could interfere in the prevalence of IR. The standard definition of overweight is BMI 25.0–29.9 kg/m², and obesity, BMI ≥ 30 kg/m². These cut-offs are based on studies involving Western populations. According to this cutoff, the prevalence of obesity (≥30) is only 2–4% in Asian populations [22], while in young Brazilian adults the prevalence of obesity is 8.1% (males) and 10.7% (females) [23]. In addition, only genotype 1b patients were included in the Japanese cohort while in this study, genotypes 1a, 1b, and 3 were included that may have contributed to the differences in results.

The IR prevalence was 42.5%, similar to previous studies (44.1%) in HCV patients [24]. IR was associated with elevated γ GT levels and fibrosis as previously shown in HCV-monoinfected patients [25]. Everhart and collaborators [25] evaluated high serum γ GT levels as a predictor for virological response and clinical end points in 1319 patients with significant liver fibrosis included in the hepatitis C anti-viral treatment against cirrhosis (HALT-C) trial.

The presence of core amino acid Q in position 70 was associated with low concentrations of vitamin D. In obese subjects, the endocrine system with insufficient vitamin D concentration is characterized by high PTH level and 1,25(OH)₂D₃ due to the negative feedback by the low hepatic synthesis of 25(OH)D, which also contributes to a higher concentration of intracellular calcium, thus decreasing secretion and sensitivity to insulin [26].

Vitamin D can affect insulin response to glucose directly or indirectly [27]. The direct effect seems to be mediated by the binding 1,25(OH)₂D₃ with a vitamin D receptor in the β -cell. Alternatively, the activation of vitamin D may occur inside the β -cells by 1 α -hydroxylase expressed into these

cells [28]. After the relationship between the metabolic pathways of vitamin D and insulin has been established, *core* protein may be a key part of this not well-established cascade.

This study presents some limitations as the small number of treated patients, lack of information regarding ethnicity, and genetic background and the small number of samples studied from each genotype group. However, few studies included HCV genotypes 1a and 3 to evaluate the impact of these mutations in insulin resistance. The absence of an association between mutations in HCV *core* aa 70 and 91 and the presence of IR suggests that genetic variability of this region has little impact on insulin resistance.

4. Materials and Methods

4.1. Study Population

Between 2011 and 2012, a total of 92 serum samples were collected from CHC patients residing in Rio de Janeiro that were referred to Viral Hepatitis Ambulatories in Rio de Janeiro (Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ; Gaffree and Guinle University Hospital, UNIRIO and Clementino Fraga Filho University Hospital, UFRJ). Patients were included if they had CHC (anti-HCV and HCV-RNA positive for more than six months) and were 18 years of age and older. Exclusion criteria were: presence of diabetes type 1 (DT1) and 2 (DM2), hepatocellular carcinoma, human immunodeficiency virus (HIV) and/or hepatitis B co-infection, autoimmune liver disease, genetic liver disease (Wilson's disease, hemochromatosis), previous HCV antiviral treatment, and excessive alcohol consumption. At the time in which blood samples were collected, no patients were treated. Some of them initiated antiviral therapy after the inclusion in the study. This study was approved by the institutional review boards. Informed consent was obtained from each patient who was included in the study, and the study protocol was followed according to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki (Ethical approval number: CAAE41269015.3.0000.5248).

4.2. Laboratorial Data

All serum samples were tested for anti-HCV using the commercial EIA kit HCV Ab (Radim, Pomezia, Italy), where all anti-HCV-reactive samples were retested in duplicate. HCV RNA viral load was determined using Abbott Real Time HCV m2000sp (Abbott Laboratories, Lake Bluff, IL, USA) and expressed as IU/mL.

A 12-h overnight fasting blood sample was drawn, to determine serum levels of alanine aminotransferase (ALT), γ -glutamyltransferase (GGT), total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL), triglycerides, ferritin, plasma glucose concentration, and platelet count. Baseline serum vitamin D level was assessed by measuring serum 25-hydroxyvitamin D levels using automated immunochemiluminometric assay (ICMA) (Liason 25 (OH) Vitamin D, Diasorin, Varceli, Italy) with 20 ng/mL being considered the threshold value. Serum insulin was determined using ICMA (*immunoquimioluminescence*) (Liason Insulin Assay, Diasorin, Varceli, Italy). Insulin resistance (IR) was determined with the homeostasis model assessment method (HOMA) (IR: $\text{HOMA} \geq 2$) ($\text{HOMA IR} = \text{fasting insulin } (\mu\text{UI/mL}) \times \text{fasting glucose (mmol/L)} / 22.5$). Hepatic fibrosis was assessed using Fib-4 and Forns index as the same as described previously [28].

4.3. Extraction of Viral RNA, Amplification of the Core Region by RT-PCR, and Sequence Analysis

RNA was extracted from 140 μL of serum by QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Inc., Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized by extension of random hexamers with Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) [29].

The RT-PCR mixture contained 1 μL (10 μM) of the corresponding type of specific primers, 417 sense: 5'-GGYGGYGGNCAGATCGTTGG-3' and 874 antisense: 5'-ARGAAGATAGARAARGAG CAACC-3' 4 μL of dNTP (1.25 mM), 4 μL of PCR buffer (10 \times), 2 μL of MgCl_2 (50 mM), 0.5 μL of Platinum[®] Taq DNA Polymerase (5 U/ μL), 7.5 μL of DNase/RNase free distilled water and 5 μL

of cDNA. The conditions for the RT-PCR step were as follows: 94 °C for 4 min; then 40 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 60 s, 72 °C for 60 s, and a final elongation at 72 °C for 7 min. The RT-PCR conditions were the same for all genotypes. A total of 4 µL of the PCR1 product was submitted to a second round of PCR in the presence of 1 µL of each internal primer (10 µM) 439 sense: 5'-GAGTWTACBTGYTGCCGCGCAG-3' and 1AS antisense: 5'-ATRTACCCCATGAGRTCGGC-3', 2.5 µL of PCR buffer (10×), 4 µL of dNTPs (1.25 mM), 2.3 µL of MgCl₂ (50 mM), 0.5 µL of Platinum[®] Taq DNA Polymerase (5 U/µL), and 12.7 µL of DNase/RNase-free distilled water. After an initial denaturation at 94 °C for 2 min, the DNA was amplified for 40 cycles at 94 °C for 30 s, 59 °C for 45 s, and 72 °C for 60 s and subjected to a final extension at 72 °C for 7 min. PCR products of the expected length of 284 base pairs were fractionated by 1.5% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide.

PCR products were purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) and submitted to nucleotide sequencing reactions in both directions using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (version 3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and analyzed on an ABI 3730 DNA automated sequencer (Applied Biosystems). The sequences obtained were aligned using the CLUSTALX program, version 1.83 and sequences were analyzed in MEGA v.6.0. After translation of nucleotide sequence into amino acids, protein sequences were evaluated in VESPA software to detect signatures or residues with different frequencies in the two sets of sequences (with and without IR).

4.4. Statistical Analysis

Continuous data were expressed as mean ± SD, and the categorical data were expressed as numbers (percentages). Statistical differences in the categorical data were evaluated by the chi-squared test with Yates correction, or Fisher exact test. Distributions of continuous variables were analyzed by Student's *t*-test or the Mann–Whitney *U* test for the two groups when appropriate. Multiple logistic regression analysis with stepwise variable selection was performed to assess the independent factors of higher HOMAIR ≥ 2 .

All evaluations were performed considering the genotype and subtype. Each group of samples with different genotypes and subtypes were evaluated separately considering their reference sequence, since differences in amino acids positions according to genotype are already known.

All the tests were performed with IBM SPSS Statistics 20.0 per Windows (Chicago, IL, USA).

Acknowledgments: The authors would like to thank Adilson José de Almeida (in memoriam) for clinical assessment of patients. Funding: This research was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazilian National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), and Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ).

Author Contributions: Letícia de Paula Scalioni, Allan Peres da Silva, Elisabeth Lampe, Livia Melo Villar conceived and designed the experiments; Letícia de Paula Scalioni, Allan Peres da Silva, Juliana Custódio Miguel, Márcia Paschoal do Espírito Santo, Vanessa Alves Marques performed the experiments; Letícia de Paula Scalioni, Allan Peres da Silva, Livia Melo Villar analyzed the data; Carlos Eduardo Brandão-Mello, Cristiane Alves Villela-Nogueira, Lia Laura Lewis-Ximenez carried out clinical assessment and patient recruitment; Letícia de Paula Scalioni and Livia Melo Villar wrote the paper, Carlos Eduardo Brandão-Mello, Cristiane Alves Villela-Nogueira, Lia Laura Lewis-Ximenez, Elisabeth Lampe did critical review of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Uraki, S.; Tameda, M.; Sugimoto, K.; Shiraki, K.; Takei, Y.; Nobori, T.; Ito, M. Substitution in amino acid 70 of hepatitis C virus core protein changes the adipokine profile via toll like receptor 2/4 signaling. *PLoS ONE* **2015**, *29*, e0131346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. CDC. *Hepatitis C Information for Health Professionals*; Department of Health and Human Services, CDC: Atlanta, GA, USA, 2008. Available online: <http://www.cdc.gov/hepatitis/HCV/index.htm> (accessed on 25 January 2017).

3. Wong, R.J.; Gish, R.G. Metabolic manifestations and complications associated with chronic hepatitis C virus infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *12*, 293–299.
4. Cannon, C.P. Mixed dyslipidemia, metabolic syndrome, diabetes mellitus, and cardiovascular disease: Clinical implications. *Am. J. Cardiol.* **2008**, *102*, 5–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lavanchy, D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* **2009**, *29*, 74–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Alter, M.J.; Mast, E.E.; Moyer, L.A.; Margolis, H.S. Hepatitis C. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **1998**, *12*, 13–26. [[CrossRef](#)]
7. Parvaiz; Parvaiz, F.; Manzoor, S.; Tariq, H.; Javed, F.; Fatima, K.; Qadri, I. Hepatitis C virus infection: Molecular pathways to insulin resistance. *Virol. J.* **2011**, *8*, 474. [[CrossRef](#)]
8. Hung, C.H.; Lee, C.M.; Lu, S.N. Hepatitis C virus associated insulin resistance: Pathogenic mechanisms and clinical implications. *Expert Rev. Anti Infect Ther.* **2011**, *9*, 525–533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Akuta, N.; Suzuki, F.; Hirakawa, M.; Kawamura, Y.; Yatsuji, H.; Sezaki, H.; Suzuki, Y.; Hosaka, T.; Kobayashi, M.; Kobayashi, M.; et al. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus *core* region of genotype 1b are the important predictor of severe insulin resistance in patients without cirrhosis and diabetes mellitus. *J. Med. Virol.* **2009**, *81*, 1032–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Akuta, N.; Suzuki, F.; Hirakawa, M.; Kawamura, Y.; Sezaki, H.; Suzuki, Y.; Hosaka, T.; Kobayashi, M.; Kobayashi, M.; Saitoh, S.; et al. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus *core* region are the important predictor of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **2007**, *46*, 1357–1364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. El-Shamy, A.; Shindo, M.; Shoji, I.; Deng, L.; Okuno, T.; Hotta, H. Polymorphisms of the *core*, NS3, and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2013**, *58*, 555–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Nakamoto, S.; Imazeki, F.; Fukai, K.; Fujiwara, K.; Arai, M.; Kanda, T.; Yonemitsu, Y.; Yokosuka, O. Association between mutations in the *core* region of hepatitis C virus genotype 1 and hepatocellular carcinoma development. *J. Hepatol.* **2010**, *52*, 72–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Akuta, N.; Suzuki, F.; Hirakawa, M.; Kawamura, Y.; Sezaki, H.; Suzuki, Y.; Hosaka, T.; Kobayashi, M.; Kobayashi, M.; Saitoh, S.; et al. Amino acid substitution in HCV *core*/NS5A region and genetic variation near *IL28B* gene affect treatment efficacy to interferon plus ribavirin combination therapy. *Intervirology* **2012**, *55*, 231–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Akuta, N.; Suzuki, F.; Hirakawa, M.; Kawamura, Y.; Yatsuji, H.; Sezaki, H.; Suzuki, Y.; Hosaka, T.; Kobayashi, M.; Kobayashi, M.; et al. Association of amino acid substitution pattern in *core* protein of hepatitis C virus genotype 2a high viral load and virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology* **2009**, *52*, 301–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Akuta, N.; Suzuki, F.; Hirakawa, M.; Kawamura, Y.; Yatsuji, H.; Sezaki, H.; Suzuki, Y.; Hosaka, T.; Kobayashi, M.; Kobayashi, M.; et al. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus *core* region of genotype 1b affect very early viral dynamics during treatment with telaprevir, peginterferon, and ribavirin. *J. Med. Virol.* **2010**, *82*, 575–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Akuta, N.; Suzuki, F.; Hirakawa, M.; Kawamura, Y.; Yatsuji, H.; Sezaki, H.; Suzuki, Y.; Hosaka, T.; Kobayashi, M.; Kobayashi, M.; et al. Amino acid substitution in HCV *core* region and genetic variation near the *IL28B* gene affect viral dynamics during telaprevir, peginterferon and ribavirin treatment. *Intervirology* **2012**, *55*, 417–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sumida, Y.; Kanemasa, K.; Hara, T.; Inada, Y.; Sakai, K.; Imai, S.; Yoshida, N.; Yasui, K.; Itoh, Y.; Okanoue, T.; et al. Impact of amino acid substitutions in hepatitis C virus genotype 1b *core* region on liver steatosis and glucose tolerance in non-cirrhotic patients without overt diabetes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2011**, *26*, 836–842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Banerjee, S.; Saito, K.; Ait-Goughoulte, M.; Meyer, K.; Ray, R.B.; Ray, R. Hepatitis C virus core protein upregulates serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and impairs the downstream Akt/protein kinase B signaling pathway for insulin resistance. *J. Virol.* **2008**, *82*, 2606–2612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Banerjee, A.; Meyer, K.; Mazumdar, B.; Ray, R.B.; Ray, R. Hepatitis C virus differentially modulates activation of forkhead transcription factors and insulin-induced metabolic gene expression. *J. Virol.* **2010**, *84*, 5936–5946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Bose, S.K.; Shrivastava, S.; Meyer, K.; Ray, R.B.; Ray, R. Hepatitis C virus activates the mTOR/S6K1 signaling pathway in inhibiting IRS-1 function for insulin resistance. *J. Virol.* **2012**, *86*, 6315–6322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Hori, M.; Kitamura, A.; Kiyama, M.; Imano, H.; Yamagishi, K.; Cui, R.; Umesawa, M.; Muraki, I.; Okada, T.; Sankai, T.; et al. Fifty-year time trends in blood pressures, body mass index and their relations in a Japanese community: The Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS). *J. Atheroscler Thromb.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Silva, C.S.; da Silva Junior, C.T.; Ferreira, B.S.; da Silva, F.D.; Silva, P.S.; Xavier, A.R. Prevalence of underweight, overweight, and obesity among 2, 162 Brazilian school adolescents. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **2016**, *20*, 228–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dai, C.Y.; Huang, J.F.; Hsieh, M.Y.; Hou, N.J.; Lin, Z.Y.; Chen, S.C.; Hsieh, M.Y.; Wang, L.Y.; Chang, W.Y.; Chuang, W.L.; et al. Insulin resistance predicts response to peginterferon- /ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C patients. *J. Hepatol.* **2009**, *50*, 712–718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Everhart, J.E.; Wright, E.C. Association of gamma-glutamyltransferase (GGT) activity with treatment and clinical outcomes in chronic hepatitis C (HCV). *Hepatology* **2012**, *57*, 1725–1733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Schuch, N.J.; Garcia, V.C.; Martini, L.A. Vitamina D e doenças endocrinometabólicas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **2009**, *53*, 625–633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zeitz, U.; Weber, K.; Soegiarto, D.W.; Wolf, E.; Balling, R.; Erben, R.G. Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB J.* **2003**, *17*, 509–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Bland, R.; Markovic, D.; Hills, C.E.; Hughes, S.V.; Chan, S.L.; Squires, P.E.; Hewison, M. Expression of 25-hydroxvitamin D3-alpha-hydroxylase in pancreatic islets. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *89*, 121–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Melo-Villar, L.; Lampe, E.; de Almeida, A.J.; de Scalioni, L.P.; Lewis-Ximenez, L.L.; Miguel, J.C.; Del Campo, J.A.; Ranchal, I.; Villela-Nogueira, C.A.; Romero-Gomez, M. Hypovitaminosis D and its relation to demographic and laboratory data among hepatitis C patients. *Ann. Hepatol.* **2016**, *15*, 139–140.
29. Martins, P.P.; Lampe, E.; Lewis-Ximenez, L.L.; de Souza, P.S.; Fernandes, C.A.; Villar, L.M. Performance of molecular methods for hepatitis C virus diagnosis: Usefulness among chronic cases and during the course of infection. *Clin. Lab.* **2013**, *59*, 1031–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5. DISCUSSÃO

5.1. Vitamina D na hepatite C crônica

No presente estudo, os níveis séricos de 25 (OH) D foram avaliados em pacientes infectados com HCV e relacionados a resposta à terapia antiviral baseada em interferon e ribavirina, características clínicas e bioquímicas. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que descreve os níveis de vitamina D entre os indivíduos infectados pelo HCV da América do Sul, dando uma nova visão sobre esse parâmetro em regiões tropicais. Os principais achados deste estudo foram: 1) alta prevalência de hipovitaminose D em pacientes infectados com HCV; 2) a associação entre baixos níveis séricos de 25OHD e alguns dados demográficos (idade) e laboratoriais (LDL, colesterol, HDL, fosfatase alcalina, hemoglobina); 3) falta de associação entre níveis séricos de 25OHD e RVS para terapia baseada em interferon e ribavirina.

Foi observada alta prevalência de hipovitaminose D (66,3%) em indivíduos brasileiros infectados pelo HCV, semelhante ao observado entre os pacientes europeus e americanos com hepatite C. Enquanto que a prevalência de hipovitaminose D variou de 46,4 a 73% entre pacientes HCV mono infectados na Itália (Petta *et al*, 2010; Bitetto *et al*, 2011; Ladero *et al*, 2013) e 86% entre indivíduos co infectados por HIV-HCV na França (Terrier *et al*, 2012). Recentemente, uma metanálise demonstrou que 71% dos indivíduos infectados com HCV da Europa e da América do Norte apresentavam níveis baixos de vitamina D (Villar *et al*, 2013). No presente estudo, níveis baixos de 25OHD no soro foram associados a valores mais elevados de média de idade, LDL, colesterol total, HDL e baixos valores médios de fosfatase alcalina e hemoglobina em análise de regressão univariada, embora apenas a idade tenha sido estatisticamente significativa na análise multivariada. Petta e colaboradores (2010) também demonstraram que a idade e o colesterol HDL estão independentemente associados a baixos níveis de vitamina D, porém o motivo dessa descoberta não é explicado.

Este estudo também demonstrou que baixos níveis de vitamina D não foram associados ao grau de fibrose conforme observado por Kitson e colaboradores e Bitetto e colaboradores (2011) entre indivíduos infectados com HCV da Austrália e França, respectivamente.

As diferenças observadas nestes estudos podem ser devido a diferentes razões: i) ausência de dados em relação à época em que a amostragem de sangue foi realizada; durante o verão, os indivíduos poderiam estar mais expostos ao sol e, conseqüentemente, poderiam apresentar níveis mais altos de vitamina D (Guzman-Fulgencio *et al*, 2014), ii) alta freqüência de fibrose grave (70,1%) no presente estudo e iii) diferentes métodos para determinação de vitamina D (HPLC para Petta *et al*, 2010 e Kitson *et al*, e eletroquimioluminescência para Bitetto *et al*, 2011 e no presente estudo).

Os níveis de vitamina D não foram associados à RVS no presente estudo, como observado anteriormente entre os pacientes com CHC na Austrália (Kitson *et al*, 2013) e entre os indivíduos coinfectados com HIV/HCV (Bitetto *et al*, 2011; Guzman-Fulgencio *et al*, 2014). Esse fato pode ser devido ao grande número de indivíduos incluídos nesse trabalho ou a algumas características genéticas da população brasileira, como a miscigenação da população. Neste estudo, a RVS foi estatisticamente associada a baixos valores médios de LDL e colesterol total, valores médios elevados de AST, ALT e plaquetas e baixo índice de fibrose.

Uma hipótese para a associação entre transaminases elevadas e RVS é que uma resposta imunológica vigorosa poderia eliminar o HCV e conseqüentemente aumentar os níveis dessas enzimas hepáticas devido a lesão no fígado. Como o HCV é um vírus que encontra-se envolvido por uma camada de VLDL e LDL, e além disso, utiliza receptor de LDL como auxiliar em sua adsorção nos hepatócitos, baixos níveis de LDL e colesterol poderiam explicar valores mais altos de RVS nestes pacientes. Berg e col. descobriram que os níveis de LDL ($\geq 2,6$ mmol / L) estão associados à RVS para a terapia baseada em telaprevir em pacientes com genótipo 1 do HCV. O baixo índice de fibrose foi associada a altas taxas de RVS, como demonstrado nos pacientes infectados com genótipos 2 e 3 do HCV que foram tratados com PEG-IFN e ribavirina (Niederau *et al*, 2014). Além disso, Ferreira e col. (2014) mostraram que altos valores de ALT estão associados à SVR entre os pacientes infectados pelo HIV/HCV no Brasil.

Dessa forma, os dados encontrados neste trabalho seriam úteis para definir estratégias bem-sucedidas para o tratamento com PEGIFN e ribavirina. A principal limitação deste estudo reside na sua natureza transversal e sua incapacidade de demonstrar a relação temporal entre 25(OH)D e dados

laboratoriais. Outra limitação é a falta de dados sobre os potenciais fatores de confusão que podem influenciar os níveis de vitamina D, como a exposição à luz do sol, a ingestão dietética e a prevalência de osteoporose. Portanto, todos os pacientes envolvidos neste estudo viveram no Rio de Janeiro, onde o sol é abundante ao longo do ano. A ausência de dados sobre polimorfismos das enzimas hidroxilantes de vitamina D e sobre outras variáveis envolvidas no metabolismo da vitamina D, como o hormônio paratireóide e na regulação da sinalização de vitamina D também pode afetar a interpretação de nossos resultados.

Em conclusão, a deficiência de vitamina D foi comum entre os pacientes brasileiros infectados com HCV e não estava associada à RVS. No entanto, uma relação de status de vitamina D e alguns dados laboratoriais que poderiam potencialmente influenciar a resposta à terapia foram observados.

Contribuição ao tópico hipovitaminose D e hepatite C crônica

Basyigit e col comentaram o nosso estudo anterior (contribution to author) no qual o objetivo foi determinar a concentração de 25(OH)D em pacientes com hepatite C pré-tratamento e o impacto na resposta virológica. Neste estudo, os pacientes com hepatite C apresentaram baixa concentração de vitamina D e relação com alguns fatores laboratoriais. Entretanto, a concentração de 25(OH)D não foi associada à resposta virológica sustentada. Basyigit e col sugeriram que outros fatores como, nível de interleucinas, polimorfismos no gene do receptor da vitamina D (VDR), má nutrição e resposta ao interferon e ribavirina poderiam estar associados a estes resultados. Estes dados não foram contemplados no primeiro estudo, porém corroborou com nossos objetivos prévios de avaliar alguns destes fatores como polimorfismos no receptor de vitamina D e a associação da concentração de vitamina D com níveis de interleucinas (dados não incluídos) em estudos seguintes.

El Husseiny e col. (2012) encontrou correlação negativa entre concentração de vitamina D e os níveis de IL-23, IL-17, e MCP-1 em pacientes com HCV genótipo 4 no Egito, sugerindo que a vitamina D pode estar envolvida na resposta imune e fibrogenese. Em conjunto, estudos conduzidos com indivíduos caucasianos europeus demonstraram que polimorfismos na cascata da vitamina D estão associados com a resposta virológica em pacientes infectados com os genótipos 1 e 5 do HCV (Lange *et al*, 2011; Falleti *et al*, 2013).

Apesar de alguns estudos demonstrarem um papel do status de vitamina D na taxa de RVS em pacientes submetidos à terapia antiviral baseada em interferon e ribavirina (Villar *et al*, 2013; Bitetto *et al*, 2011), uma metanálise de Kitson e col. (2014) demonstraram que a concentração basal de vitamina D não está associada com a RVS, peg-interferon e ribavirina, de acordo com o genótipo. Estes resultados discordantes podem ser atribuídos às diferenças genéticas, exposição ao sol e ingestão de vitamina D. A fim de alcançar conclusões definitivas sobre o papel da vitamina D na resposta ao tratamento com interferon e ribavirina é recomendado estudos clínicos prospectivos de alta qualidade.

Uma série de estudos já relatou a interação entre genes responsáveis por expressarem moléculas da cascata de metabolização e ativação da vitamina D e os níveis de 25(OH)D. Entre esses, desempenha papel importante na via vitamina D os genes que codificam o receptor de vitamina D e a proteína de ligação a vitamina D (DBP). Estudos anteriores demonstraram que as variações genéticas nestes genes tiveram um efeito significativo nos níveis de vitamina D em muitas populações, incluindo os chineses (Gong *et al*, 2010; Ren *et al*, 2015), japoneses (Miki *et al*, 2011), caucasianos (Lange *et al*, 2011; Lange *et al*, 2012; Falletti *et al*, 2012; Ladero *et al*, 2013; Zierold *et al*, 2003), meninas brasileiras saudáveis (Santos *et al*, 2013), e no presente estudo, o alelo C no SNP FokI foi associado a menores concentrações de vitamina D [25 (OH) D <20] em pacientes brasileiros com CHC.

Desta forma, levantamos a hipótese de que os determinantes genéticos dos níveis séricos de 25 (OH) D podem estar associados a dados demográficos, metabólicos e virológicos em pacientes brasileiros com hepatite C crônica. No segundo manuscrito deste estudo, avaliamos a interação entre os genes relacionados à vitamina D e os níveis de 25 (OH) D entre os pacientes infectados com HCV da América do Sul, dando uma nova visão sobre esses parâmetros em regiões tropicais.

Neste estudo, a prevalência de deficiência de vitamina D foi de 55,04%, menor que a observada anteriormente em população similar no Brasil (63%) (Melo-Villar *et al*, 2015), que utilizou um n superior ao nosso, e entre pacientes italianos com HCV (73%) (Petta *et al*, 2010; Bitetto *et al*, 2011; Bitetto *et al*, 2011; Ladero *et al*, 2013). Um trabalho brasileiro, conduzido a fim de verificar a influência da deficiência de vitamina D no metabolismo e densidade óssea,

avaliou um total de 120 homens, 20-93 anos, onde 46,7% apresentaram 25 (OH) D abaixo de 30 ng / mL e em 27,6% abaixo de 20 ng/mL (Moreira *et al*, 2017). Uma deficiência similar foi observada entre mulheres brasileiras em idade reprodutiva. Entre as 369 mulheres avaliadas, 81,1% apresentaram hipovitaminose D e 32,0% apresentaram deficiência (Lopes *et al*, 2017).

Além disso, o grau de fibrose mais grave foi encontrado em pacientes com menor concentração de vitamina D (Tabela 2), onde na análise de regressão linear múltipla, o grau de fibrose [$p < 0,001$ (CI: 0,000 - 0,844)] foi estatisticamente significativo. Lange e col. (2011) publicou um grande estudo em pacientes não cirróticos com infecção crônica por HCV, onde o nível de vitamina D foi avaliado em uma coorte de 468 pacientes e a prevalência de deficiência de vitamina D foi maior em pacientes com fibrose mais avançada, em concordância com nossos resultados. Outros estudos encontraram o contrário (Wang *et al*, 2010). Essas diferenças podem ser explicadas devido à variação no teste de 25(OH)D usado, ponto de corte de vitamina D e as diferenças étnicas e latitudes geográficas das populações estudadas em cada ensaio clínico.

A deficiência de vitamina D é comum entre os pacientes com doenças hepáticas. Porém, não se sabe se a concentração de vitamina D também pode afetar a função hepática. Neste estudo, a baixa concentração de 25(OH)D foi associada com alto valor de AST e colesterol total. Skaaby (2014) investigou a associação entre concentração de vitamina D, enzimas hepáticas e incidência de doença hepática em 2.649 indivíduos e observou que o risco de ter ALT, AST ou GGT elevados tende a ser maior para menores níveis de vitamina D, em acordo com nossos resultados. Há informações conflitantes quando se trata da ligação entre o colesterol e a vitamina D. Estudos populacionais demonstraram que as pessoas com menores níveis de vitamina D são mais propensas a ter colesterol alto, embora isso não prove uma relação de causa e efeito, apesar de estar de acordo com nossos achados (Hsia *et al*, 2007). Para o NIH, não há evidências suficientes para determinar qualquer relação entre a ingestão de vitamina D e os níveis de colesterol.

Foi encontrada uma forte associação entre níveis normais de vitamina D e o genótipo TT em FokI. Desta forma, os polimorfismos FokI C> T podem ser utilizados como um marcador molecular para prever o risco e avaliar a gravidade da doença nas pessoas infectadas com HCV, uma vez que a baixa concentração

de vitamina D está diretamente associada ao aumento da lesão hepática na população brasileira. Diferentemente, Shehab (2016) observou que os polimorfismos genéticos de VDR estão significativamente associados à ocorrência de portadores de alelos T, em pacientes com HCV tratados com terapia dupla convencional, que poderiam ser considerados como um fator de risco de carcinoma hepatocelular em pacientes egípcios.

O polimorfismo em FokI é uma transição T-C no códon de iniciação da tradução de VDR o que resulta em uma proteína mais curta com atividade biológica aumentada (Arai *et al*, 1997). Isso poderia explicar a associação entre FokI e alta concentração de HDL neste estudo. Ochs-Balcom e col. (2011) hipotetizaram uma associação positiva da variante FokI e excesso de tecido adiposo devido à diminuição da atividade biológica da proteína VDR resultante, o que poderia suprimir o efeito inibitório de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na adipogênese, mas diferente de nós, eles não encontraram nenhuma associação.

Em estudos anteriores dos genes VDR e DBP na população brasileira, os polimorfismos BsmI, ApaI, TaqI e rs4588 e rs7041 foram associados de forma mais consistente com níveis menores de 25(OH)D na população brasileira (Santos *et al*, 2013; Shehab *et al*, 2016). No entanto, no presente estudo, esses SNPs não foram associados com níveis mais baixos de 25(OH)D após a aplicação da correção de Bonferroni, assim como observado no estudo de Zhang na população chinesa. Entretanto, Falletti (2012), demonstrou que os níveis normais de vitamina D no soro e da isoforma de GC-globulina WT prevê fortemente a aquisição da RVS após a terapia antiviral com peg-interferon e ribavirina. Alguns estudos descobriram que a presença do genótipo ApaI CC e do genótipo TaqI AA estava associada a carga viral significativamente maior, em comparação com aqueles com os alelos ApaI CA/AA e TaqI AG, respectivamente (Hung *et al*, 2016). Além disso, as variantes do gene VDR podem modular os efeitos biológicos da vitamina D sem influenciar os níveis séricos de vitamina D (Wang *et al*, 2010; Santos *et al*, 2012). Algumas variáveis podem explicar essas diferenças. Está bem estabelecido que existem diferenças raciais nas relações entre as concentrações de 25(OH)D, concentração de hormônio paratireóide e homeostasia de cálcio (Uitterlinden *et al*, 2004). Diferenças raciais, na fisiologia da vitamina D ou fatores específicos da raça que modificam os efeitos da vitamina D podem afetar a resposta imune ao HCV (Gutiérrez *et al*, 2011).

Não encontramos uma associação significativa entre o haplótipo VDR bAt [CCA] e dados clínicos e laboratoriais em pacientes com HCV. O mesmo foi observado por Hung (2016), que também não encontrou nenhuma relação entre esse haplotipo e resposta à terapia com peg-interferon e ribavirina. Essas variações genéticas foram descritas como moduladores importantes de várias doenças hepáticas crônicas, como cirrose biliar primária e hepatite autoimune (Fan *et al*, 2005).

A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, a qual nos últimos cinco séculos, descende de uma mistura de europeus, ameríndios e africanos. Lins e col. (2012) analisam os polimorfismos dos receptores de vitamina D e o papel da ascendência genética em um grupo de brasileiros. A presença das variedades de alelos de risco de acordo com a ascendência, para FokI rs10735810 em nossa população foi de 0,706, superior à encontrada na população europeia (0,525), asiática (0,646) e total brasileira (0,674). No entanto, menos do que encontrado na população africana (0,833) (Lins *et al*, 211).

No presente estudo, a fibrose foi associada à BsmI rs1544410 e TaqI rs731236 o que não foi observado entre a população chinesa com infecção crônica por HCV (Hung *et al*, 2016). Para explicar a relação entre triglicerídeos séricos elevados e o efeito de TaqI rs731236, uma explicação hipotética está relacionada ao mecanismo em que a vitamina D induz a expressão de receptores de colesterol VLDL em alguns tipos de células (Ochs-Balcom *et al*, 2011). Esta situação está associada à elevação dos níveis de VLDL e triglicerídeos e é comum em pacientes com CHC (Ginsberg *et al*, 2005). A relação entre genótipo de HCV e GC permanece desconhecida.

Portanto, o presente estudo sugere uma associação significativa de VDR FokI rs10735810 e a concentração de 25(OH)D em pacientes com CHC, associação forte entre o algoritmo de fibrose, concentração de 25(OH)D, BsmI rs15444 e TaqI rs731236 e, finalmente, a associação entre GC rs7041 (Genótipo 1/Nenhum-1). Assim, existe a necessidade de identificar fatores preditivos virais e do hospedeiro que possam influenciar a taxa de RVS e evitar a exposição desnecessária a comorbidades. Os polimorfismos de genes que codificam ou regulam a expressão molecular de vias metabólicas relacionadas à vitamina D no hospedeiro podem ser úteis como marcadores de avaliação da doença e preditores de resposta terapêutica. Além disso, eles poderiam fornecer

informações úteis para a compreensão dos mecanismos complexos subjacentes à interação vírus-hospedeiro e as variações observadas nas respostas de terapia antiviral.

5.2 Resistência insulínica e hepatite C

Muitos estudos avaliaram a associação entre a infecção crônica pelo HCV, resistência à insulina e diabetes mellitus. A resistência à insulina é uma condição frequentemente detectada, coexistindo com obesidade e síndrome metabólica, e possivelmente progredindo para diabetes tipo 2. Relacionada ao HCV, a diabetes mellitus tipo 2 pode surgir de uma complexa interação entre RI, esteatose e processos inflamatórios (Desbois *et al*, 2017).

Estudos epidemiológicos indicando a associação entre diabetes tipo 2 e infecção por HCV foram publicados pela primeira vez no início da década de 1990. Mais recentemente, diversos estudos epidemiológicos proporcionaram análises mais aprofundadas da relação entre RI com fibrose hepática grave em pacientes com infecção crônica pelo HCV (Desbois *et al*, 2017) (Quadro 1)

Quadro 1. Estudos que avaliaram em análises multivariadas a relação entre presença de RI e fibrose hepática grave em pacientes infectados com vírus da hepatite C

Referência	Ano	País	Amostra (n)	Associação com fibrose severa
Konrad <i>et al</i>	2000	Alemanha	10	Sim
Sud <i>et al</i>	2004	Austrália	170	Sim
Muzzi <i>et al</i>	2005	Suíça	221	Sim
D'souza <i>et al</i>	2005	Reino Unido	59	Sim
Taura <i>et al</i>	2006	Japão	83	Sim
Leandro <i>et al</i>	2006	Itália	3068	Sim
Bugianesi <i>et al</i>	2006	Itália	132	Sim
Kita <i>et al</i>	2007	Japão	68	Sim
Petta <i>et al</i>	2008	Itália	201	Sim
Moucari <i>et al</i>	2008	França	500	Sim
Hsu <i>et al</i>	2009	Taiwan	528	Sim
Hung <i>et al</i>	2011	Taiwan	1470	Sim
Mohamed <i>et al</i>	2011	Egito	50	Sim
Conjeevaram <i>et al</i>	2011	Estados Unidos	341	Sim
Thompson <i>et al</i>	2012	Estados Unidos	1038	Sim
Alfaleh <i>et al</i>	2013	Arábia Saudita	157	Sim
Dokmeci <i>et al</i>	2014	Turquia	104	Sim
Huang <i>et al</i>	2015	Taiwan	1077	Sim
Fartoux <i>et al</i>	2005	França	141	Não
Elgouhari <i>et al</i>	2008	Estados Unidos	183	Não
Petta <i>et al</i>	2009	Itália	156	Não
Rueger <i>et al</i>	2014	Suíça	1461	Não

O presente estudo demonstrou alta prevalência de RI (62,1%) em comparação com estudos anteriores realizados na Europa (42 -46%) (Del Campo *et al*, 2013; Serfaty *et al*, 2012), América do Norte (40%) (Ramcharran *et al*, 2010), Ásia (51%) (Kiran *et al*, 2013) e Brasil (53%) (Mello *et al*, 2006). Essa diferença pode ser devido ao grande número de indivíduos incluídos no presente estudo.

Apesar de pesquisas extensas nesta área, não existe um acordo geral sobre o efeito direto da infecção pelo HCV na resistência à insulina. Um estudo realizado com 52 pacientes com CHC (idade média = 39,48) e 52 pacientes saudáveis, realizado no período de 2012 a 2015, observou prevalência de resistência à insulina em 26,9% dos pacientes com CHC e em 34,62% dos controles saudáveis. O índice HOMA médio foi de 1,93 nos pacientes e de 2,18

nos controles. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre pacientes e grupos controle em relação ao nível de insulina em jejum, glicemia em jejum, índice HOMA e resistência à insulina. Dessa forma, a hepatite C crônica não pode ser considerada como um fator de risco para a resistência à insulina e diabetes na população iraniana (Eshraghian *et al*, 2017).

Neste presente estudo, a RI foi associada à idade e aos fatores antropométricos (peso, IMC, circunferência da cintura). Alguns estudos também mostraram a associação de idade, circunferência da cintura e IMC com RI entre pacientes com HCV (Mello *et al*, 2006; Oliveira *et al*, 2009; Souza *et al*, 2011; Oliveira *et al*, 2016; Ramcharran *et al*, 2010). A RI também foi associada a maiores valores médios de triglicerídeos, o que provavelmente é devido às características do ciclo de replicação do HCV (Chang *et al*, 2016).

Alguns parâmetros bioquímicos, como ALT, AST e GGT, estavam acima dos valores normais, provavelmente como resultados da inflamação crônica do fígado. Miyajima e col. (2013) também apresentaram maiores valores médios de glicose, ALT, AST e GGT em pacientes crônicos com HCV em comparação com indivíduos não infectados do Japão.

No presente estudo, o HOMA não foi associado à carga viral do HCV, genótipo ou RVS. Embora alguns estudos tenham demonstrado uma melhora nos valores de HOMA entre os pacientes com HCV que apresentaram RVS (Del Campo *et al*, 2013) e alta carga viral entre aqueles que apresentaram RI (Michalczuk *et al*, 2012). No presente estudo, observou-se baixa prevalência de RVS, alta carga viral e predominância do genótipo 1, o que poderia explicar a falta de associação.

Foi observada uma alta prevalência de resistência à insulina entre os pacientes com HCV, demonstrando que esta população pode estar com maior risco de desenvolver diabetes mellitus tipo 2. Além disso, a RI foi associada a parâmetros demográficos (idade), antropométricos (IMC e circunferência da cintura) e laboratoriais (glicose, insulina e triglicerídeos), indicando um alto risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e distúrbios metabólicos entre pacientes com HCV.

Devido à elevada prevalência de RI em pacientes com HCV e já sabermos previamente que pacientes com HCV tem tendência ao desenvolvimento de doenças metabólicas, houve o interesse em estudar características do HCV que

pudessem estar associadas a RI. Dessa forma, realizamos nosso último manuscrito da tese com o objetivo de avaliar a associação entre mutações nas posições 70 e 91 do core do HCV a qual já foi associada previamente com o desenvolvimento de hepatocarcinoma.

O presente estudo não identificou uma associação entre a resistência à insulina e as substituições nos aminoácidos 70 e 91 do core do HCV. Por outro lado, as mutações R70Q e M91L/C do core foram previamente relatadas como associadas com a resistência insulínica (RI) no genótipo 1b no Japão (Akuta *et al*, 2009). Além disso, essas mutações foram relacionadas ao aumento do risco de HCC, (Nakamoto *et al*, 2010; Akuta *et al*, 2012), ausência de resposta virológica à terapia baseada em interferon em pacientes japoneses (Akuta *et al*, 2007), respostas variáveis ao tratamento duplo (IFN / RBV) (Akuta *et al*, 2009; Akuta *et al*, 2010), terapia tripla (telaprevir mais INF / RBV) (Akuta *et al*, 2012; Sumida *et al*, 2011) e esteatose hepática (Banerjee *et al*, 2008). Por outro lado, alguns estudos mostraram que a proteína do core do HCV aumenta a fosforilação de IRS-1, modula os reguladores de transcrição de Forkhead-box (FoxO1 e FoxO2) e ativa a via mTOR / S6K1, o que poderia contribuir para promover a RI. Estes dados mostram que a proteína do core do HCV tem um papel importante no desenvolvimento de RI, mesmo na ausência de mutações no core (Banerjee *et al*, 2010; Hori *et al*, 2016).

A ausência de associação dessas mutações no presente estudo pode ser devido à prevalência de pacientes obesos no Brasil em comparação com o Japão, o que poderia interferir na prevalência de RI. A definição padrão de sobrepeso é IMC 25,0-29,9 kg / m² e obesidade, IMC \geq 30 kg / m². Esses cortes são baseados em estudos envolvendo populações ocidentais. De acordo com esse corte, a prevalência de obesidade (\geq 30) é de apenas 2-4% nas populações asiáticas (Silva *et al*, 2016), enquanto que em adultos brasileiros jovens a prevalência de obesidade é de 8,1% (homens) e 10,7% (mulheres) (Dai *et al*, 2009). Além disso, apenas os pacientes com genótipo 1b foram incluídos na coorte japonesa enquanto que neste estudo, os genótipos 1a, 1b e 3 foram incluídos, o que podem ter contribuído para as diferenças de resultados.

A prevalência de RI foi de 42,5%, semelhante a estudos prévios (44,1%) em pacientes com HCV (Everhart *et al*, 2012). A RI foi associada a níveis elevados de γ GT e fibrose, assim como demonstrado anteriormente em pacientes

monoinfectados com HCV (Schuch *et al*, 2009). Everhart e colaboradores avaliaram os níveis elevados de γ GT no soro como preditor de resposta virológica e desfecho em 1319 pacientes com significativa fibrose hepática incluída no “*antiviral treatment against cirrhosis (HALT-C) trial*”.

A presença do aminoácido Q na posição 70 do core do HCV foi associada a baixas concentrações de vitamina D. Em indivíduos obesos, o sistema endócrino com insuficiente concentração de vitamina D é caracterizado por alto nível de PTH e $1,25(OH)_2D_3$ devido ao feedback negativo pela síntese hepática baixa de $25(OH)D$, o que também contribui para uma maior concentração de cálcio intracelular, diminuindo assim a secreção e sensibilidade à insulina (Zeitzi *et al*, 2003).

A vitamina D pode afetar a resposta da insulina à glicose, direta ou indiretamente (Bland *et al*, 2004). O efeito direto parece ser mediado pela $1,25(OH)_2D_3$ e sua ligação com o receptor de vitamina D na célula β . Alternativamente, a ativação da vitamina D pode ocorrer dentro das células β pela 1α -hidroxilase expressa nessas células (Melo-Villar *et al*, 2016). Após a relação entre as vias metabólicas de vitamina D e insulina, a proteína do core pode ser uma parte fundamental desta cascata ainda não muito bem estabelecida.

Por fim, este estudo apresenta algumas limitações, como o pequeno número de pacientes tratados, falta de informações sobre etnia e antecedentes genéticos e o pequeno número de amostras estudadas em cada grupo de genótipos. Entretanto, poucos estudos incluíram os genótipos 1a e 3 do HCV na avaliação do impacto dessas mutações na resistência à insulina. A ausência de uma associação entre mutações nos aminoácidos 70 e 91 do core do HCV e a presença de RI sugere que a variabilidade genética desta região tem pouco impacto na resistência à insulina.

6. CONCLUSÕES

- A deficiência de vitamina D foi comum entre os pacientes brasileiros infectados com HCV e não está associada à RVS. No entanto, foram observadas uma relação entre o status de vitamina D e alguns dados laboratoriais, que podem potencialmente influenciar a resposta à terapia antiviral.
- Foi observado uma associação significativa de VDR FokI rs10735810 e a concentração de 25 (OH) D em pacientes com CHC, associação forte entre o algoritmo de fibrose, concentração de 25(OH)D, BsmI rs15444 e TaqI rs731236 e, finalmente, a associação entre GC rs7041 (Genótipo 1 / Nenhum-1). Esses dados demonstram que existe a necessidade de identificar fatores preditivos virais e do hospedeiro que possam influenciar a taxa de RVS e evitar a exposição desnecessária a comorbidades.
- Uma alta prevalência de resistência à insulina foi observada entre os pacientes com HCV, demonstrando que esta população pode estar com maior risco de desenvolver diabetes mellitus tipo 2. Além disso, a RI foi associada a parâmetros demográficos (idade), antropométricos (IMC e circunferência da cintura) e laboratoriais (glicose, insulina e triglicerídeos), indicando um alto risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e distúrbios metabólicos entre pacientes com HCV.
- Não houve associação entre mutações nos aminoácidos 70 e 91 do core do HCV e a presença de RI, o que sugere que a variabilidade genética desta região tem pouco impacto na resistência à insulina.

7.REFERENCIAS

Abdelsalam A, Rashed L, Salman T, Hammad L, Sabry D. Molecular assessment of vitamin D receptor polymorphism as a valid predictor to the response of interferon/ribavirin-based therapy in Egyptian patients with chronic hepatitis C. *J Dig Dis* [Internet]. 2016 Aug [cited 2017 Aug 19];17(8):547–53.

Alter MJ, Coleman PJ, Alexander WJ, Kramer E, Miller JK, Mandel E, et al. Importance of Heterosexual Activity in the Transmission of Hepatitis B and Non-A, Non-B Hepatitis. *JAMA J Am Med Assoc* [Internet]. American Medical Association; 1989 Sep 1 [cited 2017 Aug 19];262(9):1201.

Backstedt D, Pedersen M, Choi M, Seetharam A. 25-Vitamin D levels in chronic hepatitis C infection: association with cirrhosis and sustained virologic response. *Ann Gastroenterol* [Internet]. The Hellenic Society of Gastroenterology; 2017 [cited 2017 Aug 19];30(3):344–8.

Barth H, Schäfer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, et al. Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *J Biol Chem* [Internet]. Amer soc biochemistry molecular biology inc; 2003 Oct 17 [cited 2017 Aug 19];278(42):41003–12.

Benga WJA, Krieger SE, Dimitrova M, Zeisel MB, Parnot M, Lupberger J, et al. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* [Internet]. 2010 Jan [cited 2017 Aug 19];51(1):43–53.

Belle A, Gizard E, Conroy G, Lopez A, Bouvier-Alias M, Rouanet S, et al. 25-OH vitamin D level has no impact on the efficacy of antiviral therapy in naïve genotype 1 HCV-infected patients. *United Eur Gastroenterol J* [Internet]. SAGE Publications; 2017 Feb [cited 2017 Aug 19];5(1):69–75.

Boson B, Granio O, Bartenschlager R, Cosset F-L, Vidalain P. A Concerted Action of Hepatitis C Virus P7 and Nonstructural Protein 2 Regulates Core Localization at the Endoplasmic Reticulum and Virus Assembly. Pkosz A, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. Lippincott-Raven; 2011 Jul 21 [cited 2017 Aug 19];7(7):e1002144.

Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratinier M, Targett-Adams P, Lavergne J-P, et al. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2006 Aug 4 [cited 2017 Aug 19];281(31):22236–47.

Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, Lavergne J-P. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2005 Sep [cited 2017 Aug 19];79(17):11353–65.

Brass V, Moradpour D, Blum HE. Hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro models. *J Viral Hepat* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2007 Nov 1 [cited 2017 Aug 19];14(s1):64–7.

Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. *Int J Med Sci* [Internet]. Ivyspring International Publisher; 2006 [cited 2017 Aug 19];3(2):29–34.

Brazzoli M, Helenius A, Fong SKH, Houghton M, Abrignani S, Merola M. Folding and dimerization of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins in stably transfected CHO cells. *Virology* [Internet]. 2005 Feb [cited 2017 Aug 19];332(1):438–53.

Bukh J, Miller R, Purcell R. Genetic Heterogeneity of Hepatitis C Virus: Quasispecies and Genotypes. *Semin Liver Dis* [Internet]. © 1995 by Thieme Medical Publishers, Inc.; 1995 Apr 16 [cited 2017 Aug 19];15(01):41–63.

Cabot B, Martell M, Esteban JI, Sauleda S, Otero T, Esteban R, et al. Nucleotide and amino acid complexity of hepatitis C virus quasispecies in serum and liver. *J Virol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2000 Jan [cited 2017 Aug 19];74(2):805–11.

Cavalheiro N de P. Sexual transmission of hepatitis C. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; 2007 Oct [cited 2017 Aug 19];49(5):271–7.

Ciczora Y, Callens N, Penin F, Pécheur E-I, Dubuisson J. Transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins: residues involved in E1E2 heterodimerization and involvement of these domains in virus entry. *J Virol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2007 Mar [cited 2017 Aug 19];81(5):2372–81.

Cocquerel L, Duvet S, Meunier JC, Pillez A, Cacan R, Wychowski C, et al. The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum. *J Virol* [Internet]. American Society for Microbiology; 1999 Apr 1 [cited 2017 Aug 19];73(4):2641–9.

Cocquerel L, Op de Beeck A, Lambot M, Roussel J, Delgrange D, Pillez A, et al. Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J* [Internet]. European Molecular Biology Organization; 2002 Jun 17 [cited 2017 Aug 19];21(12):2893–902.

Cun W, Jiang J, Luo G. The C-terminal alpha-helix domain of apolipoprotein E is required for interaction with nonstructural protein 5A and assembly of hepatitis C virus. *J Virol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2010 Nov [cited 2017 Aug 19];84(21):11532–41.

De Francesco R, Steinkühler C. Structure and Function of the Hepatitis C Virus NS3-NS4A Serine Proteinase. In Springer, Berlin, Heidelberg; 2000 [cited 2017 Aug 19]. p. 149–69.

Degasperi E, Aghemo A. Sofosbuvir for the treatment of chronic hepatitis C: between current evidence and future perspectives. *Hepat Med* [Internet]. Dove Press; 2014 [cited 2017 Aug 19];6:25–33.

Drazan K. Molecular Biology of Hepatitis C Infection. *Liver Transplant* [Internet]. W.B. Saunders; 2000 Jul 1 [cited 2017 Aug 19];6(4):396–406.

Drummer HE, Pountourios P. Hepatitis C virus glycoprotein E2 contains a membrane-proximal heptad repeat sequence that is essential for E1E2 glycoprotein heterodimerization and viral entry. *J Biol Chem* [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2004 Jul 16 [cited 2017 Aug 19];279(29):30066–72.

Duvet S, Cocquerel L, Pillez A, Cacan R, Verbert A, Moradpour D, et al. Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval. *J Biol Chem* [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 1998 Nov 27 [cited 2017 Aug 19];273(48):32088–95.

Farnik H, Bojunga J, Berger A, Allwinn R, Waidmann O, Kronenberger B, et al. Low vitamin D serum concentration is associated with high levels of hepatitis B virus replication in chronically infected patients. *Hepatology* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2017 Aug 19];58(4):1270–6.

Feng X, Tucker KL, Parnell LD, Shen J, Lee Y-C, Ordovás JM, et al. Insulin receptor substrate 1 (IRS1) variants confer risk of diabetes in the Boston Puerto Rican Health Study. *Asia Pac J Clin Nutr* [Internet]. NIH Public Access; 2013 [cited 2017 Aug 19];22(1):150–9.

Franck N, Le Seyec J, Guguen-Guillouzo C, Erdtmann L. Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome. *J Virol* [Internet]. American Society for Microbiology; 2005 Mar 1 [cited 2017 Aug 19];79(5):2700–8.

Fridell RA, Qiu D, Wang C, Valera L, Gao M. Resistance analysis of the hepatitis C virus NS5A inhibitor BMS-790052 in an in vitro replicon system. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. American Society for Microbiology; 2010 Sep 1 [cited 2017 Aug 19];54(9):3641–50.

Gal-Tanamy M, Bachmetov L, Ravid A, Koren R, Erman A, Tur-Kaspa R, et al. Vitamin D: An innate antiviral agent suppressing hepatitis C virus in human hepatocytes. *Hepatology* [Internet]. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2011 Nov 1 [cited 2017 Aug 19];54(5):1570–9.

Gentile I, Buonomo AR, Zappulo E, Minei G, Morisco F, Borrelli F, et al. Asunaprevir, a protease inhibitor for the treatment of hepatitis C infection. *Ther Clin Risk Manag* [Internet]. Dove Press; 2014 [cited 2017 Aug 19];10:493–504.

Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB, American Association for Study of Liver Diseases. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* [Internet]. Wiley-Blackwell; 2011 Oct [cited 2017 Aug 19];54(4):1433–44.

Herker E, Harris C, Hernandez C, Carpentier A, Kaehlcke K, Rosenberg AR, et al. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med* [Internet]. NIH Public Access; 2010 Nov [cited 2017 Aug 19];16(11):1295–8.

Hüssy P, Faust H, Wagner J-C, Schmid G, Mous J, Jacobsen H, et al. Evaluation of hepatitis C virus envelope proteins expressed in *E. coli* and insect cells for use as tools for antibody screening. *J Hepatol* [Internet]. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands; 1997 Jul 1 [cited 2017 Aug 19];26(6):1179–86.

Icard V, Diaz O, Scholtes C, Perrin-Cocon L, Ramière C, Bartenschlager R, et al. Secretion of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins Depends on Assembly of Apolipoprotein B Positive Lipoproteins. Lindenbach B, editor. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2009 Jan 21 [cited 2017 Aug 19];4(1):e4233.

Jirasko V, Montserret R, Appel N, Janvier A, Eustachi L, Brohm C, et al. Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem* [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2008 Oct 17 [cited 2017 Aug 19];283(42):28546–62.

Jirasko V, Montserret R, Lee JY, Gouttenoire J, Moradpour D, Penin F, et al. Structural and Functional Studies of Nonstructural Protein 2 of the Hepatitis C Virus Reveal Its Key Role as Organizer of Virion Assembly. Diamond MS, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. Public Library of Science; 2010 Dec 16 [cited 2017 Aug 19];6(12):e1001233.

Kanda T, Nakamoto S, Wu S, Yokosuka O. New treatments for genotype 1 chronic hepatitis C - focus on simeprevir. *Ther Clin Risk Manag* [Internet]. Dove Press; 2014 [cited 2017 Aug 19];10:387–94.

Klein RS, Freeman K, Taylor PE, Stevens CE, Dierich MP, Sivertson KT, et al. Occupational risk for hepatitis C virus infection among New York City dentists. *Lancet* [Internet]. Cambridge University Press; 1991 Dec [cited 2017 Aug 19];338(8782-8783):1539–42.

Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, et al. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase

reporter viruses. *J Virol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2006 Jun [cited 2017 Aug 19];80(11):5308–20.

Krey T, d'Alayer J, Kikuti CM, Saulnier A, Damier-Piolle L, Petitpas I, et al. The Disulfide Bonds in Glycoprotein E2 of Hepatitis C Virus Reveal the Tertiary Organization of the Molecule. Rice CM, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. Public Library of Science; 2010 Feb 19 [cited 2017 Aug 19];6(2):e1000762.

Kuntzen T, Timm J, Berical A, Lennon N, Berlin AM, Young SK, et al. Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. *Hepatology* [Internet]. NIH Public Access; 2008 Dec [cited 2017 Aug 19];48(6):1769–78.

Kushima Y, Wakita T, Hijikata M. A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J Virol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2010 Sep [cited 2017 Aug 19];84(18):9118–27.

Lam AM, Espiritu C, Bansal S, Micolochick Steuer HM, Niu C, Zennou V, et al. Genotype and subtype profiling of PSI-7977 as a nucleotide inhibitor of hepatitis C virus. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2012 Jun [cited 2017 Aug 19];56(6):3359–68.

Lee C. Daclatasvir: potential role in hepatitis C. *Drug Des Devel Ther* [Internet]. Dove Press; 2013 [cited 2017 Aug 19];7:1223–33.

Lemm JA, O'Boyle D, Liu M, Nower PT, Colonno R, Deshpande MS, et al. Identification of hepatitis C virus NS5A inhibitors. *J Virol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2010 Jan [cited 2017 Aug 19];84(1):482–91.

Li H-C, Ma H-C, Yang C-H, Lo S-Y. Production and pathogenicity of hepatitis C virus core gene products. *World J Gastroenterol* [Internet]. Baishideng Publishing Group Inc; 2014 Jun 21 [cited 2017 Aug 19];20(23):7104–22.

Lindenbach BD. Virion assembly and release. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. NIH Public Access; 2013 [cited 2017 Aug 19];369:199–218.

Lohmann V. Hepatitis C Virus RNA Replication. In Springer, Berlin, Heidelberg; 2013 [cited 2017 Aug 19]. p. 167–98.

Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* [Internet]. Inserm; 2011 May [cited 2017 Aug 19];17(5):589–95.

Manual sobre insulino-resistência, 3^o edição, 2009.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções. Brasília – DF, 2009.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica C e Coinfecções. Brasília – DF, 2011

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Suplemento 1. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C: Manejo do paciente infectado cronicamente pelo genótipo 1 do HCV e fibrose avançada. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília – DF, 2013.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS e Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos - SCTIE. Nota Técnica Conjunta nº 01/2013 - DDAHV/SVS/MS e DAF/SCTIE/MS. Brasília – DF, 2013.

del Campo JA, García-Valdecasas M, Rojas L, Rojas Á, Romero-Gómez M. The hepatitis C virus modulates insulin signaling pathway in vitro promoting insulin resistance. PLoS One [Internet]. Public Library of Science; 2012 [cited 2017 Aug 19];7(10):e47904.

GEIR-Grupo de Estudo da Insulino-Resistência da Sociedade Portuguesa de Endocrinologia Diabetes e Metabolismo. Manual sobre Insulino-Resistência [Internet]. 3a ed. Helena Cardoso, editor. Merck; 2009 [cited 2017 Aug 19]. 1-182 p.

Greca LF, Pinto LC, Rados DR, Canani LH, Gross JL. Clinical features of patients with type 2 diabetes mellitus and hepatitis C infection. Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol [Internet]. Associação Brasileira de Divulgação Científica; 2012 Mar [cited 2017 Aug 19];45(3):284–90.

Hofmann WP, Kronenberger B, Bojunga J, Stamm B, Herrmann E, Bücken A, et al. Prospective study of bone mineral density and metabolism in patients with chronic hepatitis C during pegylated interferon α and ribavirin therapy. J Viral Hepat [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2008 Jul 1 [cited 2017 Aug 19];15(11)

Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. Am J Clin Nutr [Internet]. American Society for Nutrition; 2004 Mar 1 [cited 2017 Aug 19];79(3):362–71.

Hsieh M-J, Lan K-P, Liu H-Y, Zhang X-Z, Lin Y-F, Chen T-Y, et al. Hepatitis C virus E2 protein involve in insulin resistance through an impairment of Akt/PKB and GSK3 β signaling in hepatocytes. BMC Gastroenterol [Internet]. BioMed Central; 2012 Jun 21 [cited 2017 Aug 19];12:74.

Hsieh P-S, Hsieh Y-J. Impact of liver diseases on the development of type 2 diabetes mellitus. *World J Gastroenterol* [Internet]. Baishideng Publishing Group Inc; 2011 Dec 28 [cited 2017 Aug 19];17(48):5240–5.

Knobler H, Schihmanter R, Zifroni A, Fenakel G, Schattner A, Yasuda K. Increased Risk of Type 2 Diabetes in Noncirrhotic Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Mayo Clin Proc* [Internet]. Igaku-Shoin, New York, NY; 2000 Apr 1 [cited 2017 Aug 19];75(4):355–9.

Kozlitina J, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Dissociation between APOC3 variants, hepatic triglyceride content and insulin resistance. *Hepatology* [Internet]. Wiley-Blackwell; 2011 Feb [cited 2017 Aug 19];53(2):467–74.

Ladero JM, Torrejón MJ, Sánchez-Pobre P, Suárez A, Cuenca F, de la Orden V, et al. Vitamin D deficiency and vitamin D therapy in chronic hepatitis C. 2013 [cited 2017 Aug 19];12(122):199–204.

Lange CM, Bibert S, Kutalik Z, Burgisser P, Cerny A, Dufour J-F, et al. A genetic validation study reveals a role of vitamin D metabolism in the response to interferon-alfa-based therapy of chronic hepatitis C. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2012 [cited 2017 Aug 19];7(7):e40159.

Lange CM, Bojunga J, Ramos-Lopez E, von Wagner M, Hassler A, Vermehren J, et al. Vitamin D deficiency and a CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon-alfa based therapy. *J Hepatol* [Internet]. Elsevier; 2011 May 1 [cited 2017 Aug 19];54(5):887–93.

Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2009 Jan 1 [cited 2017 Aug 19];29(s1):74–81.

Lavanchy D, Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ, et al. Viral hepatitis: Global goals for vaccination. *J Clin Virol* [Internet]. WHO Global Immunization News; 2012 Dec 1 [cited 2017 Aug 19];55(4):296–302.

Lee JG, Lee S, Kim YJ, Cho BM, Park JS, Kim HH, et al. Association of chronic viral hepatitis B with insulin resistance. *World J Gastroenterol* [Internet]. Baishideng Publishing Group Inc; 2012 Nov 14 [cited 2017 Aug 19];18(42):6120–6.

Li X, Jeffers LJ, Shao L, Reddy KR, Medina M, Scheffel J, et al. Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy. *J Viral Hepat* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 1995 Sep 1 [cited 2017 Aug 19];2(5):227–34.

Lin T-C, Yen J-M, Gong K-B, Kuo T-C, Ku D-C, Liang S-F, et al. Abnormal glucose tolerance and insulin resistance in polycystic ovary syndrome amongst the

Taiwanese population- not correlated with insulin receptor substrate-1 Gly972Arg/Ala513Pro polymorphism. *BMC Med Genet* [Internet]. BioMed Central; 2006 Apr 7 [cited 2017 Aug 19];7:36.

Mason AL, Lau JY, Hoang N, Qian K, Alexander GJ, Xu L, et al. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* [Internet]. W.B. Saunders; 1999 Feb 1 [cited 2017 Aug 19];29(2):328–33.

Masuda S, Okano T, Osawa K, Shinjo M, Suematsu T, Kobayashii T. Concentrations of vitamin D-binding protein and vitamin D metabolites in plasma of patients with liver cirrhosis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* [Internet]. Center for Academic Publications Japan; 1989 [cited 2017 Aug 19];35(4):225–34.

Matsumura T, Kato T, Sugiyama N, Tasaka-Fujita M, Murayama A, Masaki T, et al. 25-hydroxyvitamin D 3 suppresses hepatitis C virus production. *Hepatology* [Internet]. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2012 Oct 1 [cited 2017 Aug 19];56(4):1231–9.

Mena G, García-Basteiro AL, Bayas JM. Hepatitis B and A vaccination in HIV-infected adults: A review. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. Taylor & Francis; 2015 [cited 2017 Aug 19];11(11):2582–98.

Mosekilde L. Vitamin D and the elderly. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. Blackwell Science Ltd; 2005 Mar 1 [cited 2017 Aug 19];62(3):265–81.

Nimer A, Mouch A. Vitamin D improves viral response in hepatitis C genotype 2-3 naïve patients. *World J Gastroenterol* [Internet]. Baishideng Publishing Group Inc; 2012 Feb 28 [cited 2017 Aug 19];18(8):800–5.

Parvaiz F, Manzoor S, Tariq H, Javed F, Fatima K, Qadri I. Hepatitis C virus infection: molecular pathways to insulin resistance. *Virology* [Internet]. BioMed Central; 2011 Oct 18 [cited 2017 Aug 19];8:474.

Peña-Chilet M, Ibarrola-Villava M, Martín-González M, Feito M, Gomez-Fernandez C, Planelles D, et al. rs12512631 on the group specific complement (vitamin D-binding protein GC) implicated in melanoma susceptibility. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2013 [cited 2017 Aug 19];8(3):e59607.

Petta S, Cammà C, Marco V Di, Macaluso FS, Maida M, Pizzolanti G, et al. Hepatic steatosis and insulin resistance are associated with severe fibrosis in patients with chronic hepatitis caused by HBV or HCV infection. *Liver Int* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2011 Apr 1 [cited 2017 Aug 19];31(4):507–15.

Poustchi H, Negro F, Hui J, Cua IHY, Brandt LR, Kench JG, et al. Insulin resistance and response to therapy in patients infected with chronic hepatitis C virus genotypes 2 and 3. *J Hepatol* [Internet]. Elsevier; 2008 Jan 1 [cited 2017 Aug

19];48(1):28–34.

Available

from:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827807005089>

Ramos-Lopez E, Brück P, Jansen T, Herwig J, Badenhop K. CYP2R1 (vitamin D 25-hydroxylase) gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes and vitamin D levels in Germans. *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd.; 2007 Nov 1 [cited 2017 Aug 19];23(8):631–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dmrr.719>

Romero-Gómez M, Butler JL, Palmer CD, Voight BF, al. et, Agrawal R, et al. APOC3 polymorphisms and non-alcoholic fatty liver disease: resolving some doubts and raising others. *J Hepatol* [Internet]. Permanyer Publications; 2011 Dec 1 [cited 2017 Aug 19];55(6):1184–6.

Sentinelli F, Romeo S, Maglio C, Incani M, Burza MA, Scano F, et al. Lack of effect of apolipoprotein C3 polymorphisms on indices of liver steatosis, lipid profile and insulin resistance in obese Southern Europeans. *Lipids Health Dis* [Internet]. BioMed Central; 2011 Jun 10 [cited 2017 Aug 19];10:93.

Thanapirom K, Suksawatamnuay S, Sukeepaisarnjaroen W, Tangkijvanich P, Treeprasertsuk S, Thaimai P, et al. Vitamin D-related gene polymorphism predict treatment response to pegylated interferon-based therapy in Thai chronic hepatitis C patients. *BMC Gastroenterol* [Internet]. BioMed Central; 2017 Apr 17 [cited 2017 Aug 19];17(1):54.

Torquato MT da CG, Montenegro Junior RM, Viana LAL, Souza RAHG de, Lanna CMM, Lucas JCB, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. *Sao Paulo Med J* [Internet]. Associação Paulista de Medicina; 2003 [cited 2017 Aug 19];121(6):224–30.

Trépo E, Pradat P, Potthoff A, Momozawa Y, Quertinmont E, Gustot T, et al. Impact of patatin-like phospholipase-3 (rs738409 C>G) polymorphism on fibrosis progression and steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* [Internet]. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2011 Jul 1 [cited 2017 Aug 19];54(1):60–9.

Tsuneoka K, Tameda Y, Takase K, Nakano T. Osteodystrophy in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *J Gastroenterol* [Internet]. Springer-Verlag; 1996 Oct [cited 2017 Aug 19];31(5):669–78.

Weintraub SJ, Fleckenstein JF, Marion TN, Madey MA. Vitamin D-binding protein gene polymorphisms may contribute to the racial disparity in genotype 1 chronic hepatitis C treatment outcome. *Hepatology* [Internet]. NIH Public Access; 2013 Nov [cited 2017 Aug 19];58(5):1864.

White DL, Tavakoli-Tabasi S, Kanwal F, Ramsey DJ, Hashmi A, Kuzniarek J, et al. The association between serological and dietary vitamin D levels and hepatitis C-related liver disease risk differs in African American and white males. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. NIH Public Access; 2013 Jul [cited 2017 Aug 19];38(1):28–37.

WHO, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/hepatitis/en/>>

WHO, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/hepatitis/en/>>

Chen S, Wang Y. Evolutionary study of hepatitis C virus envelope genes during primary infection. *Chin Med J (Engl)* [Internet]. 2007 Dec 20 [cited 2017 Aug 19];120(24):2174–80.

Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. National Academy of Sciences; 1991 Mar 15 [cited 2017 Aug 19];88(6):2451–5.

Choo Q, Kuo G, Weiner A, Overby L, Bradley D, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* (80-) [Internet]. 1989 [cited 2017 Aug 19];244(4902).

Ciczora Y, Callens N, Montpellier C, Bartosch B, Cosset F-L, Beeck A Op De, et al. Contribution of the charged residues of hepatitis C virus glycoprotein E2 transmembrane domain to the functions of the E1E2 heterodimer. *J Gen Virol* [Internet]. Microbiology Society; 2005 Oct 1 [cited 2017 Aug 19];86(10):2793–8.

Courcambeck J, Bouzidi M, Perbost R, Jouirou B, Amrani N, Cacoub P, et al. Resistance of hepatitis C virus to NS3-4A protease inhibitors: mechanisms of drug resistance induced by R155Q, A156T, D168A and D168V mutations. *Antivir Ther* [Internet]. 2006 [cited 2017 Aug 19];11(7):847–55.

Davis GL. Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Am J Med* [Internet]. 1999 Dec 27 [cited 2017 Aug 19];107(6B):21S – 26S.

Dewar TN. Non-A, non-B hepatitis. *West J Med* [Internet]. BMJ Publishing Group; 1990 Aug [cited 2017 Aug 19];153(2):173–9.

Dore GJ, Law M, MacDonald M, Kaldor JM. Epidemiology of hepatitis C virus infection in Australia. *J Clin Virol* [Internet]. 2003 Feb [cited 2017 Aug 19];26(2):171–84.

Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 1994 Oct [cited 2017 Aug 19];68(10):6147–60.

Dubuisson J, Rice CM. Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *J Virol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 1996 Feb [cited 2017 Aug 19];70(2):778–86.

Dumoulin FL, von dem Bussche A, Li J, Khamzina L, Wands JR, Sauerbruch T, et al. Hepatitis C Virus NS2 Protein Inhibits Gene Expression from Different Cellular and Viral Promoters in Hepatic and Nonhepatic Cell Lines. *Virology* [Internet]. 2003 Jan; 305(2):260–6.

Eshraghian K, Lankarani KB, Fattahi MR, Esmailnejad A, Peymani P. Low Prevalence of Insulin Resistance among Iranian Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection: A Case-Control Study. *Curr Diabetes Rev* [Internet]. 2017

Eshraghian K, Lankarani KB, Fattahi MR, Esmailnejad A, Peymani P. Low Prevalence of Insulin Resistance among Iranian Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection: A Case-Control Study. *Curr Diabetes Rev* [Internet]. 2017 [cited 2017 Aug 19].

Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2007 Apr 12 [cited 2017 Aug 19];446(7137):801–5.

Feeney ER, Chung RT. Antiviral treatment of hepatitis C. *BMJ* [Internet]. 2014 [cited 2017 Aug 19];349. Available from: <http://www.bmj.com/content/349/bmj.g3308>

Feld JJ, Ocama P, Ronald A. The liver in HIV in Africa. *Antivir Ther* [Internet]. 2005 [cited 2017 Aug 19];10(8):953–65.

Forns X, Bukh J. The molecular biology of hepatitis C virus. Genotypes and quasispecies. *Clin Liver Dis* [Internet]. 1999 Nov [cited 2017 Aug 19];3(4):693–716, vii.

Fraser GM, Harman I, Meller N, Niv Y, Porath A. Diabetes mellitus is associated with chronic hepatitis C but not chronic hepatitis B infection. *Isr J Med Sci* [Internet]. 1996 Jul [cited 2017 Aug 19];32(7):526–30.

Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* [Internet]. 2010 May 6 [cited 2017 Aug 19];465(7294):96–100.

Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 1993 Mar [cited 2017 Aug 19];67(3):1385–95.

Hammad LN, Abdelraouf SM, Hassanein FS, Mohamed WA, Schaal MF. Circulating IL-6, IL-17 and vitamin D in hepatocellular carcinoma: Potential

biomarkers for a more favorable prognosis? *J Immunotoxicol* [Internet]. Taylor & Francis; 2013 Oct 25 [cited 2017 Aug 19];10(4):380–6.

Hauri AM, Armstrong GL, Hutin YJF. The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. *Int J STD AIDS* [Internet]. SAGE PublicationsSage UK: London, England; 2004 Jan 25 [cited 2017 Aug 19];15(1):7–16.

He LF, Alling D, Popkin T, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J Infect Dis* [Internet]. 1987 Oct [cited 2017 Aug 19];156(4):636–40.

Hristea A, Petre R, Gliga S, Olaru I, Ion M, Moroti R, et al. The management of acute retroviral syndrome. *J Int AIDS Soc* [Internet]. 2010 [cited 2017 Aug 19];13(Suppl 4):P2.

Hussein AG, Mohamed RH, Alghobashy AA. Synergism of CYP2R1 and CYP27B1 polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Egyptian children. *Cell Immunol* [Internet]. 2012 Sep [cited 2017 Aug 19];279(1):42–5.

Kahn CR. The Molecular Mechanism of Insulin Action. *Annu Rev Med* [Internet]. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA ; 1985 Feb 28 [cited 2017 Aug 19];36(1):429–51.

Kasuga M, Karlsson F, Kahn C. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* (80-) [Internet]. 1982 [cited 2017 Aug 19];215(4529).

Kawaguchi T, Ide T, Taniguchi E, Hirano E, Ito M, Sumie S, et al. Clearance of HCV Improves Insulin Resistance, Beta-Cell Function, and Hepatic Expression of Insulin Receptor Substrate 1 and 2. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2007 Mar [cited 2017 Aug 19];102(3):570–6.

Khaliq S, Jahan S, Pervaiz A. Sequence variability of HCV Core region: Important predictors of HCV induced pathogenesis and viral production. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2017 Aug 19];11(3):543–56.

Mandorfer M, Reiberger T, Payer BA, Ferlitsch A, Breitenecker F, Aichelburg MC, et al. Low vitamin D levels are associated with impaired virologic response to PEGIFN + RBV therapy in HIV–hepatitis C virus coinfecting patients. *AIDS* [Internet]. 2013 Jan [cited 2017 Aug 19];27(2):227–32.

Martins PP, Lampe E, Lewis-Ximenez LL, de Souza PSF, Fernandes CA, Villar LM. Performance of molecular methods for hepatitis C virus diagnosis: usefulness among chronic cases and during the course of infection. *Clin Lab* [Internet]. 2013 [cited 2017 Aug 19];59(9-10):1031–9.

Mohamed AA, Sabry NA, Abbassi MM, Ibrahim WA, Ali-Eldin ZA. Vitamin D levels in Egyptian HCV patients (genotype 4) treated with pegylated interferon. *Acta Gastroenterol Belg* [Internet]. 2013 Mar [cited 2017 Aug 19];76(1):38–44.

Monegal A, Navasa M, Guañabens N, Peris P, Pons F, Martinez de Osaba MJ, et al. Osteoporosis and bone mineral metabolism disorders in cirrhotic patients referred for orthotopic liver transplantation. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 1997 Feb [cited 2017 Aug 19];60(2):148–54.

Moucari R, Forestier N, Larrey D, Guyader D, Couzigou P, Benhamou Y, et al. Danoprevir, an HCV NS3/4A protease inhibitor, improves insulin sensitivity in patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Gut* [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2017 Aug 19];59(12):1694–8.

Parolin MB, Réa R, Vargas RM, de Almeida ACR, Baldanzi GR, Lopes RW. [Prevalence of hepatitis C infection in patients with type 2 diabetes mellitus]. *Arq Gastroenterol* [Internet]. [cited 2017 Aug 19];43(2):77–80.

Peres-da-Silva A, Almeida AJ de, Lampe E. Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2012 Mar [cited 2017 Aug 19];107(2):254–61.

Popescu C, Gliga S, Aramă V. Trends in hepatitis C virus infection therapy: protease inhibitors a step forward in the era of direct acting antivirals. *Rom J Intern Med* [Internet]. [cited 2017 Aug 19];50(2):117–27.

Prosser D, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2004 Dec [cited 2017 Aug 19];29(12):664–73.

Romero-Gómez M. Insulin resistance and sustained virological response in hepatitis C: from bench to bedside. *Liver Int* [Internet]. 2011 Jan [cited 2017 Aug 19];31(1):1–3.

Romero-Gómez M, Del Mar Vitoria M, Andrade RJ, Salmerón J, Diago M, Fernández-Rodríguez CM, et al. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* [Internet]. 2005 Mar [cited 2017 Aug 19];128(3):636–41.

Romero-Gómez M, Fernández-Rodríguez CM, Andrade RJ, Diago M, Alonso S, Planas R, et al. Effect of sustained virological response to treatment on the incidence of abnormal glucose values in chronic hepatitis C. *J Hepatol* [Internet]. 2008 May [cited 2017 Aug 19];48(5):721–7.

Rosen CJ. Vitamin D Insufficiency. *N Engl J Med* [Internet]. Massachusetts Medical Society ; 2011 Jan 20 [cited 2017 Aug 19];364(3):248–54.

Sersté T, Nkuize M, Moucari R, Van Gossum M, Reynders M, Scheen R, et al. Metabolic disorders associated with chronic hepatitis C: impact of genotype and ethnicity. *Liver Int* [Internet]. 2010 Jun 9 [cited 2017 Aug 19];30(8):1131–6.

Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, et al. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* [Internet]. 2004 Mar [cited 2017 Aug 19];126(3):840–8.

Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus - 15 years on. *J Gen Virol* [Internet]. 2004 Nov 1 [cited 2017 Aug 19];85(11):3173–88.

Stättermayer AF, Stauber R, Hofer H, Rutter K, Beinhardt S, Scherzer TM, et al. Impact of IL28B Genotype on the Early and Sustained Virologic Response in Treatment-Naïve Patients With Chronic Hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2017 Aug 19];9(4):344–50.e2.

Suneetha PV, Goyal A, Hissar SS, Sarin SK. Studies onTAQ1 polymorphism in the 3'untranslated region of IL-12P40 gene in HCV patients infected predominantly with genotype 3. *J Med Virol* [Internet]. 2006 Aug [cited 2017 Aug 19];78(8):1055–60.

Takahashi T, Nakagawa S, Hashimoto T, Takahashi K, Imai M. Large-scale isolation of Dane particles from plasma containing hepatitis B antigen and demonstration of circular double-stranded DNA molecule extruding directly from their cores. *J Immunol* [Internet]. 1976 Oct [cited 2017 Aug 19];117(4):1392–7.

Taylor SI, Kadowaki T, Accili D, Cama A, Kadowaki H, McKeon C, et al. Mutations in the insulin receptor gene in genetic forms of insulin resistance. *Recent Prog Horm Res* [Internet]. 1990 [cited 2017 Aug 19];46:185–213; discussion 213–7.

Valenti L, Rumi M, Galmozzi E, Aghemo A, Del Menico B, De Nicola S, et al. Patatin-Like phospholipase domain-containing 3 I148M polymorphism, steatosis, and liver damage in chronic hepatitis C. *Hepatology* [Internet]. 2011 Mar [cited 2017 Aug 19];53(3):791–9.

White DL, Ratziu V, El-Serag HB. Hepatitis C infection and risk of diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* [Internet]. 2008 Nov [cited 2017 Aug 19];49(5):831–44.

White DL, Ratziu V, El-Serag HB. Hepatitis C infection and risk of diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* [Internet]. 2008 Nov [cited 2017 Aug 19];49(5):831–44.

White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* [Internet]. 1997 Jul [cited 2017 Aug 19];40 Suppl 2:S2–17.

Younossi ZM, McCullough AJ. Metabolic syndrome, non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C virus: impact on disease progression and treatment response. *Liver Int* [Internet]. 2009 Mar [cited 2017 Aug 19];29:3–12.

WHO | Hepatitis. WHO [Internet]. World Health Organization; 2017 [cited 2017 Aug 19].

Alter HJ, Holland PV, Morrow AG, Purcell RH, Feinstone SM, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet*. 1975;2(7940):838-841.

Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, *et al*. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med*. 1989;321(22):1494-1500.

Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Popper H. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet*. 1978;1(8062):459-463.

Bradley DW, Cook EH, Maynard JE, McCaustland KA, Ebert JW, Dolana GH, *et al*. Experimental infection of chimpanzees with antihemophilic (factor VIII) materials: recovery of virus-like particles associated with non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol*. 1979;3(4):253-269.

Bradley DW, Maynard JE, Cook EH, Ebert JW, Gravelle CR, Tsiquaye KN, *et al*. Non-A/non-B hepatitis in experimentally infected chimpanzees: cross-challenge and electron microscopic studies. *J Med Virol*. 1980;6(3):185-201.

Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology*. 1985;88(3):773-779.

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;244(4902):359-362.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med*. 1975;292(15):767-770.

Hollinger FB, Gitnick GL, Aach RD, Szmuness W, Mosley JW, Stevens CE, *et al*. Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees: a project of the transfusion-transmitted viruses study group. *Intervirology*. 1978;10(1):60-68.

Hollinger FB, Dolana G, Thomas W, Gyorkey F. Reduction in risk of hepatitis transmission by heat-treatment of a human Factor VIII concentrate. *J Infect Dis*. 1984;150(2):250-262.

Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, *et al*. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1989;244(4902):362-364.

- Tabor E, Gerety RJ, Drucker JA, Seeff LB, Hoofnagle JH, Jackson DR, *et al.* Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet.* 1978;1(8062):463-466.
- Dunlop TW, Vaisanen S, Frank C, Molnar F, Sinkkonen L, Carlberg C. The human peroxisome proliferator-activated receptor delta gene is a primary target of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor. *J Mol Biol.* 2005;349:248-260.
- Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Kumar R. Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)2D3 receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas. *Am J Physiol.* 1994;267:E356-360.
- Weinstein SJ, Purdue MP, Smith-Warner SA, Mondul AM, Black A, Ahn J, *et al.* Serum 25-hydroxyvitamin D, vitamin D binding protein and risk of colorectal cancer in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial. *Int J Cancer.* 2015;136:E654-664.
- Taes YE, Goemaere S, Huang G, Van Pottelbergh I, De Bacquer D, Verhasselt B, *et al.* Vitamin D binding protein, bone status and body composition in community-dwelling elderly men. *Bone.* 2006;38:701-707.
- Safadi FF, Thornton P, Magiera H, Hollis BW, Gentile M, Haddad JG, *et al.* Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. *J Clin Invest.* 1999;103:239-251.
- Kim SH, Choi GS, Nam YH, Kim JH, Hur GY, Kim SH, *et al.* Role of vitamin D-binding protein in isocyanate-induced occupational asthma. *Exp Mol Med.* 2012;44:319-329.
- Holick MF. Vitamin D: extraskeletal health. *Rheum Dis Clin North Am.* 2012;38:141-160.
- Hosseini-nezhad A, Holick MF. Optimize dietary intake of vitamin D: an epigenetic perspective. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012;15:567-579.
- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357:266-281.
- Mathieu C, Badenhoop K. Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of the art. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16:261-266.
- Henry HL. Regulation of vitamin D metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25:531-541.
- Hosseini-nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc.* 2013;88:720-755.
- Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1717s-1720s.

Ahmed SZ, Jaleel A, Hameed K, Qazi S, Suleman A. Does vitamin D deficiency contribute to the severity of asthma in children and adults? *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2015;27:458-463.

Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics*. 2008;122:398-417.

Handono K, Sidarta YO, Pradana BA, Nugroho RA, Hartono IA, Kalim H, *et al*. Vitamin D prevents endothelial damage induced by increased neutrophil extracellular traps formation in patients with systemic lupus erythematosus. *Acta Med Indones*. 2014;46:189-198.

Reddy KK. Reply to Glossmann: vitamin D compounds and oral supplementation methods. *J Invest Dermatol*. 2013;133:2649.

Zhang Z, Zhang H, Hu Z, Wang P, Wan J, Li B. Synergy of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and carboplatin in growth suppression of SKOV-3 cells. *Oncol Lett*. 2014;8:1348-1354.

Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2004;80:1678s-1688s.

Premaor MO, Furlanetto TW. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. *Arq. Bras Endocrinol Metab*. 2006;50(1):25-37.

Brumbaugh PF, Haussler MR. 1 Alpha,25-dihydroxycholecalciferol receptors in intestine. I. Association of 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol with intestinal mucosa chromatin. *J Biol Chem*. 1974;249(4):1251-1257.

Pike JW, Meyer MB. The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(2):255-269.

Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*. 1995;83(6):841-850.

Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, *et al*. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res*. 1998;13(3):325-349.

Sergeev IN, Rhoten WB. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 evokes oscillations of intracellular calcium in a pancreatic beta-cell line. *Endocrinology*. 1995;136(7):2852-2861.

Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, *et al*. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol*. 1997;11(8):1165-1179.

El-Zayadi AR, Anis M. Hepatitis C virus induced insulin resistance impairs

- response to anti viral therapy. *World J Gastroenterol.* 2012;18(3):212-224.
- Alter MJ, Mast EE, Moyer LA, Margolis HS. Hepatitis C. *Infect Dis Clin North Am.* 1998;12(1):13-26.
- Arababadi MK, Pourfathollah AA, Jafarzadeh A, Hassanshahi G, Rezvani ME. Association of exon 9 but not intron 8 VDR polymorphisms with occult HBV infection in south-eastern Iranian patients. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010;25(1):90-93.
- Baur K, Mertens JC, Schmitt J, Iwata R, Stieger B, Eloranta JJ, *et al.* Combined effect of 25-OH vitamin D plasma levels and genetic vitamin D receptor (NR 111) variants on fibrosis progression rate in HCV patients. *Liver Int.* 2012;32(4):635-643.
- Bitetto D, Fattovich G, Fabris C, Ceriani E, Falletti E, Fornasiere E, *et al.* Complementary role of vitamin D deficiency and the IL-28B rs12979860 C/T polymorphism in predicting antiviral response in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2011;53:1118-1126.
- Bouillon R, Auwerx J, Dekeyser L, Fevery J, Lissens W, De Moor P. Serum vitamin D metabolites and their binding protein in patients with liver cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984;59(1):86-89.
- Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, *et al.* Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev.* 2008;29(6):726-776.
- Cannon CP. Mixed dyslipidemia, metabolic syndrome, diabetes mellitus, and cardiovascular disease: clinical implications. *Am J Cardiol* 2008;102(12A):5L-9L.
- Hung CH, Hu TH, Lee CM, Huang CM, Chen CH, Wang JH, *et al.* Amino acid substitutions in the core region associate with insulin resistance in chronic hepatitis C. *Intervirology.* 2013;56(3):166-171.
- Chiefari E, Tanyolac S, Iiritano S, Sciacqua A, Capula C, Arcidiacono B, *et al.* A polymorphism of HMGA1 is associated with increased risk of metabolic syndrome and related components. *Sci Rep.* 2013;3:1491.
- 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;244(4902):359-362.
- Conjeevaram HS, Kleiner DE, Everhart JE, Hoofnagle JH, Zacks S, Afdhal NH, *et al.* Race, insulin resistance and hepatic steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2007;45(1):80-87.
- Corradini SG, Burza MA, Molinaro A, Romeo S. Patatin-like phospholipase domain containing 3 sequence variant and hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2011;53:1776–1777.

Costa LM, Mussi AD, Brianeze MR, Souto FJ. Hepatitis C as a risk factor for diabetes type 2: lack of evidence in a hospital in central-west brazil. *Braz J Infect Dis.* 2008;12(1):24-26.

Douglas MW, George J. Molecular mechanisms of insulin resistance in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2009;15(35):4356-4364.

El Husseiny NM, Fahmy HM, Mohamed WA, Amin HH. Relationship between vitamin D and IL-23, IL-17 and macrophage chemoattractant protein-1 as markers of fibrosis in hepatitis C virus Egyptians. *World J Hepatol.* 2012;4:242-247.

Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, San Millán JL. The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Ver.* 2005;26:251-282.

Espírito-Santo MP, Carneiro MA, Reis NR, Kozłowski AG, Teles SA, Lampe E, *et al.* Genotyping hepatitis C virus from hemodialysis patients in Central Brazil by line probe assay and sequence analysis. *Braz J Med Biol Res.* 2007;4:545-550.

Falleti E, Betetto D, Fabris C, Fattovich G, Cussigh A, Ceriani E, *et al.* Vitamin D binding protein gene polymorphisms and baseline vitamin D levels as predictors of antiviral response in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2012;56:1641-1650.

Farag YM, Gaballa MR. Diabetes: an overview of a rising epidemic. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(1):28-35.

Lyra AC, Ramrakhiani S, Bacon BR, Di Bisceglie AM. Infection with hepatitis C virus genotype 4 in the United States. *J Clin Gastroenterol.* 2004; 38:68-71.

Ma HC, Ku YY, Hsieh YC, Lo SY. Characterization of the cleavage of signal peptide at the C-terminus of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase. *Journal of Biomedical Science.* 2007;14:31-41.

Ma Y, Anantpadma M, Timpe JM, Shanmugam S, Singh SM, Lemon SM, Yi M. Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *Journal of Virology.* 2011; 85:86-97.

Majeau N, Fromentin R, Savard C, Duval M, Tremblay MJ, Leclerc D. Palmitoylation of hepatitis C virus core protein is important for virion production. *The Journal of Biological Chemistry.* 2009; 284:33915-33925.

Martins T, Narciso-Schiavon JL, Schiavon LL. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. *Rev Assoc Med Bras.* 2011; 57:107-112.

Menzel N, Fischl W, Hueging K, Bankwitz D, Frentzen A, Haid S, Gentsch J, Kaderali L, Bartenschlager R, Pietschmann T. MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathogens.* 2012;8.

Michalak JP, Wychowski C, Choukhi A, Meunier JC, Ung S, Rice CM, Dubuisson J. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of General Virology*. 1997;78:2299–2306.

Mitsui T, Iwano K, Masuko K, Yamazaki C, Okamoto H, Tsuda F, Tanaka T, Mishiro S. Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. *Hepatology*. 1992; 16:1109-14.

Montserret R, Saint N, Vanbelle C, et al. NMR structure and ion channel activity of the p7 protein from hepatitis C virus. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285:31446–31461.

Murphy D, Chamberland J, Dandavino R, Sablon E. A new genotype of hepatitis C virus originating from Central Africa. *Hepatology*. 2007; 46: 623.

Neddermann P, Quintavalle M, Di Pietro C, Clementi A, Cerretani M, Altamura S, Bartholomew L, De Francesco R. Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *Journal of Virology*. 2004; 78:13306–13314.

Op De Beeck A, Montserret R, Duvet S, Cocquerel L, Cacan R, Barberot B, Le Maire M, Penin F, Dubuisson J. The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275:31428–31437.

Op De Beeck A, Dubuisson J. Topology of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Reviews in Medical Virology*. 2003;13:233–241.
Ogino T, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Kohara M, Nomoto A. Membrane binding properties and terminal residues of the mature hepatitis C virus capsid protein in insect cells. *Journal of Virology*. 2004;78:11766–11777.

Okamoto K, Mori Y, Komoda Y, Okamoto T, Okochi M, Takeda M, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *Journal of Virology*. 2008;82:8349–8361.

Pascu M, Martus P, Höhne M, Wiedenmann B, Hopf U, Schreier E, et al. Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences. *Gut*. 2004; 53(9):1345-51.

Patel J, Patel AH, McLauchlan J. The transmembrane domain of the hepatitis C virus E2 glycoprotein is required for correct folding of the E1 glycoprotein and native complex formation. *Virology*. 2001; 279:58–68.

Pawlotsy JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends in Microbiol*. 2004;12: 96-102

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

- Plauzolles A, Lucas M, Gaudieri S. Hepatitis C Virus Adaptation to T-Cell Immune Pressure. *The Scientific World Journal*. 2013.
- Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*. 2009; 457:882–886.
- Popescu CI, Callens N, Trinel D, Roingeard P, Moradpour D, Descamps V, Duverlie G, Penin F, Héliot L, Rouillé Y, Dubuisson J. Ns2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog*. 2011; 7:e1001278.
- Prince AM, Huima-Byron T, Parker TS, Levine DM. Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins. *J Viral Hepat*. 1996; 3:11-17.
- Raney KD, Sharma SD, Moustafa IM, Cameron CE. Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): A multifunctional antiviral target. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285:22725–22731.
- Roingeard P, Hourieux C, Blanchard E, Brand D, Ait-Goughoulte M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol Cell*. 2004;96:103-108.
- Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of Hepatitis C virus. *Journal of Molecular Biology*. 2001;313:451–464.
- Rouillé Y, Helle F, Delgrange D, Roingeard P, Voisset C, Blanchard E, Belouzard S, McKeating J, Patel AH, Maertens G, Wakita T, Wychowski C, Dubuisson J. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *Journal of Virology*. 2006;80:2832–2841.
- Sainz B Jr, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nature Medicine*. 2012;18:281–285.
- Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tani H, Roy SR, Tanaka J, Tsubuki M, Akimitsu N. PBDE: structure-activity studies for the inhibition of hepatitis C virus NS3 helicase. *Molecules*. 2014;2:4006-20.
- 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 USA*. 2003; 100:11646-11651.
- Santolini E, Migliaccio G, La Monica N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *Journal of Virology*. 1994;68:3631–3641.