



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JORGE PAULO SALES DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA HIPOVITAMINOSE D NO
ESTRESSE OXIDATIVO E NOS MARCADORES CLÍNICOS E
LABORATORIAIS DA INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS
DA HEPATITE C**

JORGE PAULO SALES DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA HIPOVITAMINOSE D NO
ESTRESSE OXIDATIVO E NOS MARCADORES CLÍNICOS E
LABORATORIAIS DA INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS
DA HEPATITE C**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Isaías Dichi.

Londrina
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A447a Almeida, Jorge Paulo Sales de.
Avaliação da influência da hipovitaminose D no estresse oxidativo e nos marcadores clínicos e laboratoriais da infecção crônica pelo vírus da hepatite C / Jorge Sales de Almeida - Londrina, 2015.
75 f. : il.

Orientador: Isaías Dichi.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Hepatite C. – Teses. 2. Hepatite por vírus - Teses. 3. Estresse oxidativo - Teses. 4. Ferro no organismo - Teses. 5. Vitamina D – Teses. I. Dichi, Isaías. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 616.36-002

JORGE PAULO SALES DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA HIPOVITAMINOSE D NO
ESTRESSE OXIDATIVO E NOS MARCADORES CLÍNICOS E
LABORATORIAIS DA INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA
HEPATITE C**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Isaías Dichi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profª. Dra Andréa Name Colado Simão
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir a iniciar e concluir este trabalho.

À minha família, principalmente aos meus pais, que me apoiaram e me incentivaram durante todos os momentos.

Aos meus orientadores Professora Dra. Andréa Name Colado Simão e Professor Dr. Isaías Dichi pela confiança e pela dedicação em me orientar, sei que sem eles este trabalho não seria realizado.

À todos os participantes da nossa equipe de trabalho pela ajuda e companheirismo durante todas as etapas deste trabalho.

Ao meu amigo e companheiro, Lucas Silva Liberatti, por ser um fiel amigo pra todas as horas desde a graduação e pela parceria desde o início até o fim deste trabalho.

À minha namorada, Flaviane Faria Gonçalves, que considero também minha família, pelo apoio, paciência e pela ajuda na correção ortográfica desta dissertação.

A todos meus amigos pela amizade durante o mestrado.

Aos pacientes e doadores que se dispuseram a participar e assim possibilitaram a realização desta pesquisa.

À Fundação CAPES, pelo apoio financeiro.

Almeida, Jorge Paulo Sales de. **Avaliação da influência hipovitaminose D no estresse oxidativo e nos marcadores clínicos e laboratoriais da infecção crônica pelo vírus da hepatite C** 2015. 75 f. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Apesar da deficiência de vitamina D mudar a progressão lesão hepática de pacientes com HCV, os principais mecanismos moleculares envolvidos são pouco conhecidos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre o estresse oxidativo e hipovitaminose D em pacientes com HCV e verificar se o estresse oxidativo está envolvido com mecanismos moleculares de lesão hepática. Este estudo incluiu 147 indivíduos: 89 controles e 58 pacientes com HCV (Vit D <30, n = 32 e vit D > 30, = 26). Os pacientes com HCV e hipovitaminose D apresentaram um significativo aumento do índice APRI (*aminotransferase-to-platelet ratio index*) ($p = 0,0464$) e da carga viral ($p = 0,0426$) comparados com os pacientes com HCV sem hipovitaminose D. Quanto ao estresse oxidativo, os pacientes HCV com hipovitaminose D apresentaram maiores índices de estresse oxidativo (IEO) ($p = 0,0196$), de produtos avançados da oxidação protéica (AOPP) ($p = 0,0409$) e de metabólitos de óxido nítrico ($p = 0,0206$), e enquanto a capacidade antioxidante total do plasma (TRAP) ($p = 0,0446$), foi significativamente menor do que os pacientes com HCV sem hipovitaminose D. A análise multivariada demonstrou que hidroperóxidos lipídicos, AOPP e IEO foram associados com a presença de hipovitaminose D. Em pacientes com HCV a vitamina D apresentou correlação inversa com os níveis de ferro ($r = -0,407$, $p = 0,0285$), de ferritina ($r = -0,383$, $p = 0,0444$), de APRI ($r = -0,762$, $p = 0,0280$) e de γ glutamil transpeptidase ($r = -0,453$, $p = 0,0154$) e também com os níveis de hidroperóxidos lipídicos no plasma ($r = -0,426$, $p = 0,0189$). Os pacientes com HCV e hipovitaminose D demonstraram um perfil mais desfavorável ao estresse oxidativo e ao clínico-laboratorial do que pacientes com HCV sem hipovitaminose D. O perfil de marcadores de estresse oxidativo em pacientes HCV depende dos níveis de vitamina D.

Palavras-chave: Vírus da hepatite C. Vitamina D. Estresse oxidativo. Marcadores de lesão hepática. Metabolismo do ferro.

Almeida, Jorge Paulo Sales de. **Evaluation of influences of hypovitaminosis D in oxidative stress, clinical and laboratory markers of chronic infection with hepatitis C** 2015. 75 p. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Although vitamin D deficiency can change liver injury progression in HCV patients, the main molecular mechanisms involved are largely unknown. The first aim of this study was to evaluate the association between oxidative stress and hypovitaminosis D in patients with HCV. A second objective was to verify if oxidative stress is evolved in the molecular mechanisms related to liver injury. The study included 147 subjects: 89 controls and 58 HCV patients (Vit D <30, n=32 and vit D >30, n=26). Patients with HCV and hypovitaminosis D presented significantly higher aminotransferase-to-platelet ratio index (APRI) (p=0.0464) and viral load (p=0.0426) compared to the patients with HCV without hypovitaminosis D. Regarding oxidative stress, HCV patients with hypovitaminosis D had higher advanced oxidation protein products (AOPP) (p=0.0409), nitric oxide metabolites (p=0.0206) levels and oxidative stress index (OSI) (p=0.0196), whereas total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) (p=0.0446) levels were significantly lower than HCV patients without hypovitaminosis D. Vitamin D in HCV patients showed inverse correlations with levels of iron (r= -0.407, p= 0.0285), ferritin (r= -0.383, p=0.0444), APRI (r= -0.762, p= 0.0280) and γ glutamyl transpeptidase (r= -0.453, p=0.0154) and also with plasma lipid hydroperoxides levels (r= -0.426, p= 0.0189). In conclusion, vitamin D insufficiency contributes to the inflammatory process and oxidative stress imbalance in patients with HCV. The profile of oxidative stress markers in HCV patients depends on vitamin D levels, which probably change intracellular signaling pathways and increase inflammation and liver injury.

Keywords: Hepatitis C virus. Vitamin D. Oxidative stress. Liver injury markers. Iron metabolism

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25-(OH) ₂ D ₃	1,25-dihidroxitamina D ₃
25-(OH)D ₃	25-hidroxitamina D ₃
4NHE	4-hidroxi-2-nonenal
7-DHC7	diidrocolesterol
8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
ALT	<i>Alanina aminotransferase</i>
AOPP	Produtos avançados da oxidação proteica
APRI	Índice AST/contagem de plaquetas
AST	<i>Aspartato aminotransferase</i>
CLDN-1	Claudin1
CYP2424-	hidroxilase
CYP27B1	1- α -hidroxilase
CYP2R1	25-hidroxilase
DCs	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA fita dupla
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidermal
EphA2	<i>Ephrin A2</i>
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERVD	Elementos de resposta à vitamina D
FGF-23	Fator de crescimento de fibroblasto
GAG	Glicosaminoglicana
GH	Hormônio do crescimento
GSH	Glutationa
GSSH	Glutationa oxidada
GGT	Gama glutamil transpeptidase
hCAP18	Catelicidina
HCC	Hepatite C crônica
HCV	Vírus da hepatite C
HO-1	Heme-oxigenase-1
HRV1	Região hipervariável 1

IEO	índices de estresse oxidativo
IFN- α	Interferon- α
IFN- β	Interferon- β
IFN- λ	Interferon- λ
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-17	Interleucina-17
IL-18	Interleucina-18
IL-2	Interleucina-2
IL-21	Interleucina-21
IL-23	Interleucina-23
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
iNOS	inducible Nitric oxide synthase
IRES	Sítio de entrada ribossomal
IRF3	Fator 3 regulador de interferon
ISGs	<i>Interferon stimulated genes</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLR	Receptor para lipoproteína de alta densidade
LVP	Lipopartículas virais
MAVS	<i>Specifically by mitochondrial antiviral signaling protein</i>
MCH	Complexo principal de histocompatibilidade
MnSOD	Manganês superóxido dismutase
NANB	hepatites não-A e não-B
NF- κ B	Fator nuclear- κ B
NO	Oxido nítrico
PRRs	Receptor de reconhecimento do patógeno
PTH	Paratormônio
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene-I</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RVD	Receptor para a vitamina D
RVS	Resposta virológica sustentada

RXR	Receptor retinóico X
SR-BI	<i>Scavenger receptor class B member 1</i>
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
Th1	<i>T-helper 1</i>
Th17	<i>T-helper 17</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TRAP	<i>Total radical-trapping antioxidant parameter</i>
TRX	Tioredoxina
VHA	Vírus da hepatite A
VHB	Vírus da hepatite B

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
Hepatite C	12
Estrutura viral e invasão celular	13
Resposta imune	15
HCV e perfil redox	16
Reposta inflamatória e estresse oxidativo	16
HCV e estresse oxidativo mitocondrial	19
Vitamina D	20
Vitamina D e sistema imune	23
Papel da vitamina D na resposta imune contra o HCV	24
Vitamina D e seu papel antioxidante	25
Vitamina D e HCV	25
JUSTIFICATIVA	26
OBJETIVOS	27
Objetivo Geral	27
MATERIAIS E MÉTODOS	27
Aspectos Éticos	27
Delineamento do Estudo	27
Indivíduos	27
Critérios de inclusão e exclusão para os pacientes	28
Critérios de inclusão e exclusão para os controles	28
Medidas antropométricas e de pressão arterial	28
Biomarcadores bioquímicos e imunológicos	29
Índice de proporção aminotransferase e plaquetas (APRI)	29
Determinação dos Níveis séricos de vitamina D	29
Determinação da Carga Viral e Genótipo	30
Biomarcadores de estresse oxidativo	30
Avaliação do Estresse Oxidativo	30
Quimiluminescência Induzida por t-Butil Hidroperóxidos (CL-LOOH)	30
Determinações de Produtos Avançados da Oxidação Protéica (AOPP)	30
Índice de estresse oxidativo (IEO)	31
Relação entre parâmetros pró-oxidante (AOPP) com antioxidantes (TRAP) determinou a IEO	31
Análise Estatística	32
RESULTADOS	32
Abstract	35
1 Introduction	36
2 Patients and Methods	37
2.1 Anthropometric Measurements	38

2.2	Biochemical and Immunological Biomarkers	38
2.3	Aminotransferase-to-platelet ratio index	38
2.4	Oxidative Stress Biomarkers	39
2.5	Analysis of tert-Butyl-Hydroperoxide-Initiated Chemiluminescence	39
2.6	Determination of Advanced Oxidation Protein Products	40
2.7	Determination of carbonyl protein	40
2.8	Determination of Nitric Oxide Metabolites	40
2.9	Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter	40
2.10	Oxidative Stress Index	41
2.11	Statistical Analysis	41
3	Results	41
4	Discussion	43
5	Disclosure	46
6	REFERENCES	47
	CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO	56
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO 1 -	PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA	66
ANEXO 2 -	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	67
ANEXO 3 -	NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO NA REVISTA NUTRITION RESEARCH	69

INTRODUÇÃO

Hepatite C

Nas décadas de 1970 e 1980, desconheciam-se as causas etiológicas dos casos de hepatite pós-transfusão sanguínea. Na primeira metade da década de 1970, testes de triagem sorológicos direcionados à investigação dos vírus das hepatites A (VHA) e B (VHB) revelaram que 25% dos casos de hepatite associados às transfusões sanguíneas estavam relacionadas com o VHB. Os casos remanescentes, 75%, foram considerados como hepatites não-A e não-B (NANB). Aproximadamente 10 a 12% dos indivíduos que haviam recebido múltiplas transfusões desenvolveram hepatite NANB, com risco relativo de 0,45% por unidade transfundida (ABDALLA et al., 2005; ALTER, 1994; ALTER et al., 1982). Em 1989, pesquisadores da Chiron Corporation conseguiram sequenciar o genoma do vírus, denominando-o de vírus da hepatite C. Com prevalência em torno de 170 milhões de portadores, o vírus da hepatite C (HCV) está entre uma das principais causas de doença hepática crônica (LAUER; WALKER, 2001). No Brasil há cerca de 1,5 milhões de pessoas cronicamente infectadas (KRETZER et al., 2014).

O HCV possui seis genótipos principais e numerosos subtipos. O genótipo 1 é o mais prevalente, ocorrendo em cerca de 40 a 80% da população mundial infectada. A disposição da prevalência dos vários genótipos apresenta distribuição geográfica bastante variável. Alguns genótipos do HCV, como 1a, 1b, 2a e 2b, têm distribuição em todo o mundo; outros, como 5a e 6a, são encontrados em regiões geográficas específicas. No Brasil, há poucos estudos sobre soroprevalência de genótipos. De modo geral, predomina o genótipo 1 em 50 a 60% dos casos; o tipo 2 em 3 a 5%; e o tipo 3 em cerca de 35% (mais frequente na região Sul). Os genótipos 4, 5 e 6 são raros (BRUGGMANN et al., 2014; NAGAYAMA et al., 2000; NEUMANN et al., 2000; SALAUN et al., 2006).

Aproximadamente em 70% dos casos, o HCV leva à hepatite crônica (HCC) podendo progredir para cirrose e hepatocarcinoma (LAUER; WALKER, 2001). A resposta imune do hospedeiro determinará se o vírus será ou não erradicado do organismo. Em média, 20-30% dos indivíduos cronicamente infectados desenvolvem cirrose em 2 a 3 décadas e aproximadamente 4%

destes evoluem para hepatocarcinoma (TONG et al., 1995). Embora não se conheça o mecanismo exato que o vírus causa injúria à célula, sabe-se que o estresse oxidativo, representado por espécies reativas de oxigênio e por espécies reativas de nitrogênio (EROs/ ERNs), está profundamente envolvido com seu efeito deletério (KOIKE; MIYOSHI, 2006).

Estrutura viral e invasão celular

O HCV (hepatitis C vírus) é um vírus hepatotrópico do gênero hepacivirus da família *Flaviviridae* (CHOO et al., 1989) com aproximadamente 9626 nucleotídeos de comprimento (JACKA et al., 2013) envelopado em fita única de RNA. O genoma do HCV tem uma fita de leitura contínua que é flanqueada por uma região não codificante 5' e 3' (KIM; CHANG, 2013). A região não codificante 5' contém o sítio de entrada ribossomal (IRES - *Internal Ribosome Entry Site*), que inicia a tradução do RNA viral de forma cap-independente, resultando em uma poliproteína (HONDA et al., 1996) com cerca de 3000 aminoácidos que posteriormente será clivada por proteases do vírus e do hospedeiro em 10 proteínas virais (KIM; CHANG, 2013) divididas em duas classes: as proteínas estruturais - componente C do nucleocapsídeo, E1 e E2 glicoproteínas do envelope; e as proteínas não estruturais - NS1, NS2, NS3 (RNA helicase), NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (RNA polimerase) (PARVAIZ et al., 2011). A partícula viral consiste em um nucleocapsídeo envolto por uma bicamada lipídica onde estão ancoradas duas glicoproteínas estruturais E1 e E2 (HELLE; DUBUISSON, 2008). As glicoproteínas E1 e E2 expressas simultaneamente possuem papel fundamental para o vírus entrar na célula do hospedeiro (BARTOSCH; DUBUISSON; COSSET, 2003), a porção N-terminal da proteína E2 possui uma região hipervariável (HRV1), esta variação pode contribuir para a evasão viral do sistema imune (BOWEN; WALKER, 2005). Para entrar no hepatócito o vírus necessita de uma série de receptores celulares, inicialmente a proteína E2 viral interage diretamente com o LDL *low density lipoprotein*, formando uma lipopartícula viral (LVP) (WUNSCHMANN et al., 2006), que em seguida se liga a glicosaminoglicana (GAG) específica e ao receptor de LDL. Após este reconhecimento, a lipopartícula viral se liga ao receptor scavenger classe B tipo 1 SR-B1 e em sequência é transferida ao CD-81. Provavelmente, este complexo vírus-receptor migra lateralmente para

região de junção estreita onde interage com a claudina1, e então finalmente o hepatócito realiza endocitose do HCV através de clatrina. Em seguida, as proteínas do envelope viral sofrem uma mudança conformacional, favorecidas pelo pH ácido do endossomo e se fundem à membrana endossomal liberando assim o RNA do vírus ao citosol para tradução (HARRIS et al., 2010; HELLE; DUBUISSON, 2008). Entretanto, há outras estruturas envolvidas na infectividade do HCV, entre elas dois receptores de tirosina quinase, o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) e o *ephrin A2* (EphA2) que regulam a co-interação do CD-81 à claudina1 (CLDN-1), e estruturas como a ocludina e o *Niemann-Pick C1-like1 receptor* de absorção de colesterol que são fatores que auxiliam na entrada do vírus (KIM; CHANG, 2013).

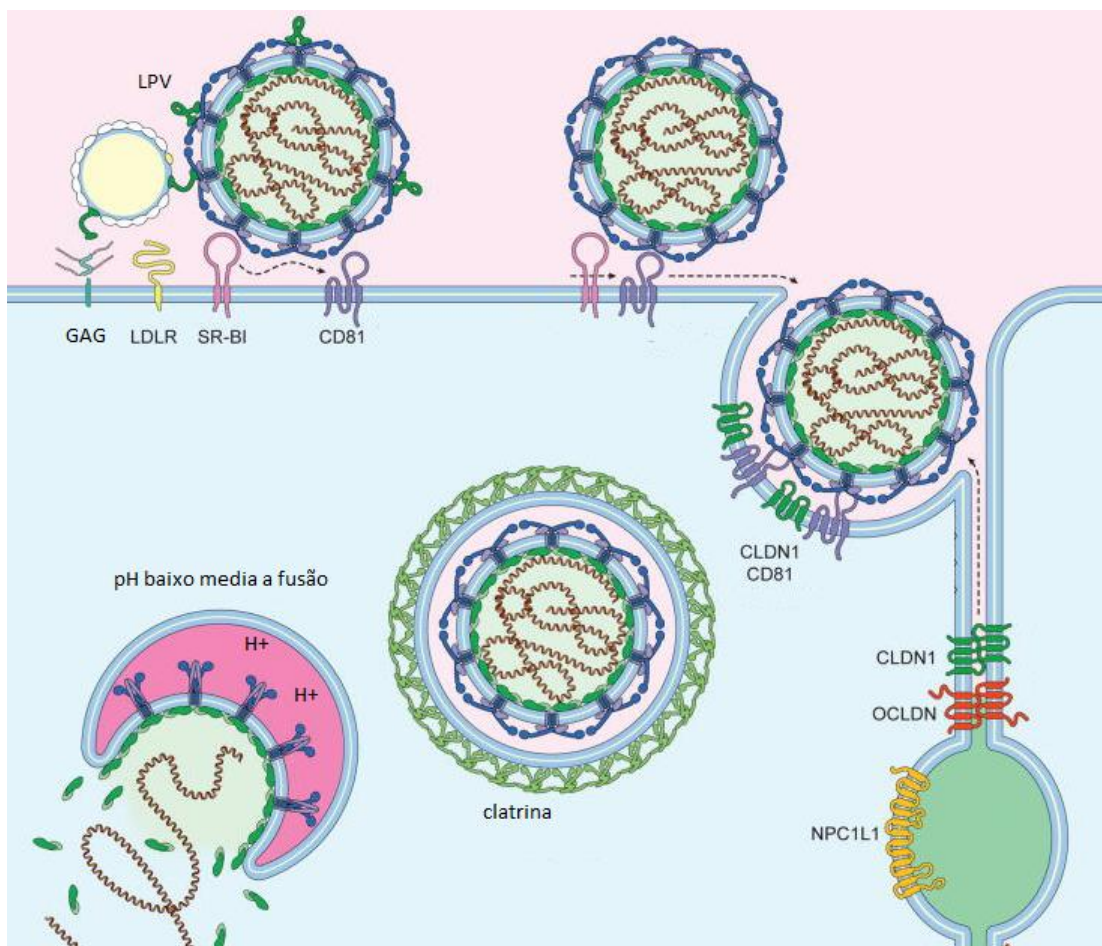


Figura 1: Modelo da entrada do HCV no hepatócito. A proteína E2 viral interage diretamente com o LDL formando uma lipopartícula viral (LVP), que em seguida se liga a GAG específica e ao RLDL. Após este reconhecimento, a lipopartícula viral se liga ao SR-B1 e em sequência é transferida ao CD-81. Este complexo vírus-receptor migra lateralmente para região de junção estreita

onde interage com a CLDN-1, e então finalmente ocorre a endocitose através de clatrininas. Em seguida, favorecidas pelo pH ácido do endossomo, as proteínas do core se fundem à membrana endossomal liberando o RNA viral. LDL: *low density lipoprotein*, LVP: lipopartícula viral, GAG: glicosaminoglicana, RLDL: receptor de LDL, SR-B1: receptor scavenger classe B tipo 1, CLDN-1: claudina1.

Fonte: adaptado LINDENBACH; RICE, (2013).

Resposta imune

Uma vez dentro da célula do hospedeiro, a primeira linha de defesa contra o vírus se baseia na imunidade inata dos hepatócitos que reconhece o HCV como não próprio e induz resposta antiviral local que pode modular a resposta adaptativa (HORNER; GALE, 2013). Através de três padrões de reconhecimento de receptores (PRRs - *pathogen recognition receptor*), a célula hospedeira reconhece os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*) virais; o primeiro é a proteína quinase eIF2 α -quinase que reconhece o IRES no RNA do HCV e com auxílio da proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS - *Specifically by mitochondrial antiviral signaling protein*) induz a síntese de interferon- β (ARNAUD et al., 2011). O segundo é o gene-I induzível de ácido retinóico (RIG-I – *retinoic acid inducible gene-1*) que inicia a sinalização intracelular após reconhecer e ligar ao RNA por grupamento trifosfato exposto na região 5' e por uma sequência rica em poli-U/UC ribonucleotídeos na região 3' (HORNUNG et al., 2006; SAITO et al., 2008); o RIG-I, auxiliado pela proteína chaperona 14-3-3 ϵ e pela E3 ubiquitina ligase TRIM25, interage com o MAVS. Esta interação promove uma cascata de sinalização para sintetizar o fator 3 regulador de interferon (IRF3 - *interferon regulatory factor-3*), o fator nuclear-kB (NF-kB) e uma variedade de citocinas inflamatórias (LIU et al., 2012; LOO; GALE, 2011). O terceiro PRR é o receptor *toll-like 3* (TLR3). Este receptor está presente nos hepatócitos e nas células de Kupffer, responsável pela detecção endossomal do dsRNA (SEKI; BRENNER, 2008) e sinalização para produção de interferon tipo 1, quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e apoptose celular por ativação das caspases (SALAUN et al., 2006). Os hepatócitos infectados secretam quimiocinas como CXCL1, CXCL11, CCL3 e CCL5, que atraem ao fígado

células do sistema imune inclusive linfócitos CD4+ e CD8+ específicas do vírus (LARRUBIA, 2008).

Além de penetrar nos hepatócitos, o RNA viral invade as células de Kupffer, (porque está presente em células em apoptose que são fagocitadas) e as células apresentadoras de antígeno (porque é transferido pelos hepatócitos). As células de Kupffer e as células apresentadoras de antígeno secretam citocinas da família dos genes estimulados por interferon (ISGs - *interferon stimulated genes*), interferon- λ (IFN- λ), interferon- α (IFN- α) e interferon- β (IFN- β), que em conjunto com as quimiocinas coordenam a resposta imune (HORNER; GALE, 2013). Cooper et al. (1999) relatou que em chimpanzés não é essencial a produção de anticorpos e Post et al. (2004) evidenciou que a soroconversão não é essencial para que a infecção seja autolimitada. Em cerca de 70% a 80%, esta resposta imune não elimina o vírus (SEEFF, 2009) devido a fatores do hospedeiro como MCH I e II, resposta fraca ou anérgica dos linfócitos específicos ou pela mutação viral entre outros. Assim, a infecção se torna crônica com atração para o fígado de linfócitos não específicos que não são capazes de conterem a replicação viral, havendo progressão para o dano hepático (LARRUBIA, 2008). Interleucina1 β produzida pelos macrófagos, altos níveis de IFN- γ , fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-18 (IL-18) e interleucina-2 (IL-2) também são fundamentais para o dano hepático (MCGUINNESS et al., 2000; NEGASH et al., 2013). Células T-reg, estão relacionadas com menores níveis de enzimas hepáticas e com menor grau de inflamação hepática na fase crônica da doença.

HCV e perfil redox

Reposta inflamatória e estresse oxidativo

Agente ou consequência? Esta é a dúvida que ultimamente gira em torno do estresse oxidativo em muitas doenças de caráter crônico como artrite, hipertensão, esclerose múltipla e outras. Estresse oxidativo é condição conhecida como excesso na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) ou diminuição da produção de moléculas antioxidantes. EROS e ERNs, genericamente conhecidas como radicais livres (RL), são espécies capazes de existência independente, em sua

maioria contendo um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência (HALLIWELL, 1994). Estas espécies reagem com componentes celulares como proteínas, DNA, lipídeos e carboidratos gerando injúria aos tecidos e no longo prazo levando a doenças (HALLIWELL, 2012). Porém, estas moléculas também têm importante ação fisiológica como, por exemplo, papel no *burst* respiratório e sinalização intracelular (HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014).

O estresse oxidativo causado diretamente pelo vírus ou pela resposta imune do hospedeiro tem um papel fundamental na patogênese da hepatite C (FACTOR et al., 2000). Em biópsias hepáticas de pacientes com HCV, observaram-se aumento de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), 4-hidroxi-2-nonenal (4NHE) e malondialdeído (MDA), também presente em soro de pacientes com hepatite C crônica, e correlacionado com o grau de inflamação ou de fibrose (PARADIS et al., 1997; SHIMODA et al., 1994; YADAV et al., 2002). Estudos relatam que níveis de glutatona reduzida (GSH) estão diminuídos e de glutatona oxidada (GSSH) estão elevados no sangue, no fígado e no sistema linfático de pacientes com HCV sugerindo excesso de oxidação do glutatona reduzida (FARINATI et al., 1995; SWIETEK; JUSZCZYK, 1997). Baixos níveis de antioxidantes não enzimáticos lipossolúveis foram encontrados no soro e no fígado de pacientes com hepatite C crônica, sendo que a gravidade da inflamação não afetou os níveis de antioxidantes hepáticos (retinol, γ - e α -tocoferol, luteína, β -criptoxantina, licopene, α - e β -caroteno mensurados por HPLC); entretanto, o grau de fibrose foi associado com os níveis diminuídos de antioxidantes hepáticos, exceto com o α -caroteno (YADAV et al., 2002).

Em modelos hepáticos *in vitro*, a expressão do core viral e da proteína NS5B demonstrou elevar os níveis de EROs, diminuir os de glutatona reduzida, elevar os níveis de manganês superóxido dismutase (MnSOD), e aumentar a oxidação da proteína thioredoxina (TRX), antioxidante que tem importante papel em processos de proliferação celular e de apoptose; já os níveis de catalase e heme-oxigenase-1 (HO-1) se elevaram com a expressão do NS5B, porém não com a expressão do core que demonstrou impacto negativo nestas enzimas (ABDALLA et al., 2005; QADRI et al., 2004; WEN et

al., 2004), sendo que a replicação do core elevou os níveis de manganês superóxido dismutase e inibiu a apoptose celular (HARA et al., 2006). Estudos mais recentes *in vitro* relataram que isoladamente as proteínas C, E1, E2, NS4B e NS5A, além de induzirem o aumento de EROs, estimulam a via Nrf2/ARE, responsável pela ativação de enzimas antioxidantes e da apoptose (BURDETTE; OLIVAREZ; WARIS, 2010; IVANOV et al., 2011); contudo, Carvajal-Yepes et al. (2011) demonstraram a supressão da via Nrf2/ARE por aquelas proteínas. A proteína NS5A induziu a ativação do NF- κ B e STAT-3 (GONG et al., 2001), enquanto as proteínas NS3-4a, NS5A e core induziram a elevação dos níveis de EROs e inibiram a NEIL1, enzima DNA glicosilase envolvida na restauração de danos oxidativos do DNA (PAL et al., 2010). Em biópsias hepáticas, HCV não demonstrou efeito aparente na expressão de manganês superóxido dismutase e catalase, mas houve diminuição da proteína HO-1 (ABDALLA et al., 2005; WEN et al., 2004).

De maneira geral o HCV tem mostrado desequilibrar direta e indiretamente as defesas de antioxidantes endógenos e estimular a geração de espécies reativas de oxigênio, tanto local quanto sistemicamente.

Vários estudos demonstraram sobrecarga de ferro no fígado de pacientes infectados cronicamente pelo HCV. Provavelmente, um dos mecanismos que pode contribuir para este acúmulo de ferro é o core+1/ARF e as EROs geradas diretamente pelo HCV que levam à supressão da hepcidina, enzima que regula negativamente a absorção de ferro (KOTTA-LOIZOU et al., 2013; MIURA et al., 2008).

Venturini et al. (2009) demonstraram que o soro de pacientes não tratados com HCV apresentam níveis elevados de atividade pró-oxidante, de enzimas hepáticas, de ferritina, de saturação da transferrina e menor capacidade antioxidante total plasmática, sendo que as substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) se correlacionaram positivamente com níveis de AST e com a saturação da transferrina.

Valores de AST/ALT, hidroxiprolina, malondialdeído, superóxido dismutase, índice AST/contagem de plaquetas (APRI), capacidade antioxidante

total do plasma (TAS) podem predizer a fibrose e cirrose em pacientes com hepatite C crônica com elevado grau de acurácia (GABR; ALGHADIR, 2014). Níveis de hidroperóxidos, de óxido nítrico (NO) e o desequilíbrio entre potencial pró e antioxidante plasmático estão correlacionados à fibrose hepática (CAPONE et al., 2012). Pacientes com HCV apresentam maiores níveis plasmáticos de thioredoxina e de manganês superóxido dismutase que indivíduos saudáveis, sendo que em pacientes com hepatocarcinoma os níveis desses marcadores foram maiores comparados com aqueles sem hepatocarcinoma (TAMAI et al., 2011). Também foram encontrados valores plasmáticos significativamente elevados de LDL oxidada e seus níveis se correlacionaram diretamente com a carga viral e com o grau de inflamação de pacientes com hepatite C crônica (NAKHJAVANI et al., 2011). A infecção por HCV demonstrou diminuir a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase e reduzir os níveis de vitamina B2, B6 e folato plasmático (LIN et al., 2011).

HCV e estresse oxidativo mitocondrial

O HCV pode alterar as funções, o perfil redox e a sinalização de cálcio mitocondrial com importantes consequências para o paciente. Em condições normais, as EROs são mantidas em concentrações baixas por um delicado balanço de aporte de Ca^{2+} , geração de EROs, produção de energia e limpeza dos EROs (BRAULT; LEVY; BARTOSCH, 2013); em condições fisiológicas, a porcentagem de elétrons que não completa a cadeia transportadora de elétrons e vai para a geração de radical livre superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$ é muito baixa, de 0,1 a 0,2% do oxigênio consumido (TAHARA; NAVARETE; KOWALTOWSKI, 2009). Korenaga et. al. (2005) demonstraram que as proteínas virais E1, E2 e C oxidaram o *pool* glutathiona, diminuíram os níveis de NADPH e inibiram a atividade de transporte do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias hepáticas de camundongos. Consequentemente, houve aumento dos níveis de EROs com dano celular e do core viral, com elevação dos níveis de aporte mitocondrial de cálcio. O aumento de Ca^{2+} altera o funcionamento de várias enzimas mitocondriais, o que gera estresse oxidativo e leva também à translocação de STAT-3 e de NF- κ B ao núcleo (BRAULT; LEVY; BARTOSCH, 2013). A proteína do core e a NS3 do HCV induzem diretamente a produção de

óxido nítrico (NO), que inativa enzimas da cadeia respiratória, desse modo inibindo a transferência de elétrons e interrompendo o potencial de membrana com consequente aumento da produção de EROs (MACHIDA et al., 2006).

Vitamina D

Há muito tem se estudado o papel da vitamina D, entretanto nos últimos 7 anos houve um aprofundamento no conhecimento de seus notáveis benefícios para a saúde humana, além dos efeitos clássicos já conhecidos (HEWISON, 2012). A vitamina D pode ser obtida através de duas fontes: na forma de vitamina D₂, conhecida como ergocalciferol, mediante ingestão de alimentos de origem vegetal, e na forma de vitamina D₃, conhecida como colecalciferol, mediante ingestão de alimentos de origem animal, principalmente óleo de fígado de bacalhau; a outra fonte, e mais importante, deste pró-hormônio é a pele. Quando exposta aos raios UVB, o 7-diidrocolesterol (7-DHC) presente na epiderme sofre uma clivagem fotolítica e é convertido em pré-vitamina D₃, que por isomerização termal espontânea se transforma em vitamina D₃ (HOLICK, 2004). Entretanto, quando há exposição solar em excesso, a pré-vitamina D₃ é convertida por reação reversível em seus metabólitos biologicamente inativos, lumisterol e taquisterol; por sua vez, altas concentrações de melanina na epiderme e uso de bloqueadores solar, por absorver os raios UVB, diminuem a produção de vitamina D₃ (BIKLE, 2009; MATSUOKA et al., 1987)

A vitamina D₃ é transportada pela proteína ligante da vitamina D até o sistema porta, no fígado (mas não exclusivamente), onde sofre um processo de hidroxilação pela enzima 25-hidroxilase (CYP2R1) no carbono de posição 25, resultando em 25-hidroxivitamina D₃ (25-(OH)D₃); para ser efetivamente formado o hormônio na sua forma ativa, essa molécula é novamente hidroxilada principalmente pela 1- α -hidroxilase renal (CYP27B1) no carbono de posição 1, resultando em 1,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃) conhecido como calciferol (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005; ZHANG et al., 2010); a 1- α -hidroxilase também é encontrada em células do sistema imune, dos ossos, em células epiteliais de outros tecidos e nas glândulas da paratireóide (HEWISON et al., 2007). A 1- α -hidroxilase é positivamente

regulada por calcitonina, paratormônio (PTH), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e pelo hormônio do crescimento (GH), hormônios esses que regulam a concentração de cálcio e de fosfato. Por outro lado, é regulada negativamente pela própria concentração do calciferol, pelo fator de crescimento de fibroblasto (FGF)-23, pelo Klotho (proteína transmembrana que atua como co-receptor para o (FGF)-23 presente principalmente nos rins) (GKENTZI et al., 2014) e pelo fosfato. Com a diminuição do cálcio, por perda renal ou baixa absorção intestinal, há um aumento de liberação do PTH pelas glândulas da paratireóide, o qual estimula a atividade da 1- α -hidroxilase. Em casos de altas concentrações de vitamina D, a 24-hidroxilase (CYP24) é ativada. Esta enzima catalisa uma série de reações de oxidação nos carbonos de posição 23 e 24 da 1,25-dihidroxitamina D3, resultando em clivagem de sua cadeia lateral e sua inativação, evitando assim seu excesso. A 24-hidroxilase está presente em todas as células alvo deste hormônio, é induzida pelo fosfato e por seu substrato e inibida pelo PTH (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005; HENRY; NORMAN, 1984; WU et al., 1996).

Como a 25-hidroxitamina D3 é a forma mais estável, com meia vida de aproximadamente 2 semanas e está em maior concentração, este é o metabólito utilizado nas análises para verificar o status da vitamina D (BAEKE et al., 2010b). O nível de vitamina D3 considerado adequado é superior a 30ng/mL; nível entre 10-30 ng/mL é considerado hipovitaminose moderada e hipovitaminose grave quando o nível for inferior a 10 ng/mL (MANDORFER et al., 2013).

Os metabólitos da vitamina D são lipossolúveis e devem ser transportados na circulação sistêmica por proteínas, sendo a principal delas, com quantidade 20 vezes maior que os metabólitos, a proteína ligante da vitamina D (PLV), cuja afinidade é maior pelas 25-hidroxitamina D3 e 24,25-dihidroxitamina D3 seguidas pela 1,25-dihidroxitamina D3 e vitamina D3 (COOKE; HADDAD, 1989). Embora a albumina e lipoproteínas se liguem aos metabólitos de vitamina D, 99% estão ligadas à PLV (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005). Metabólitos ligados à PLV têm acesso limitado às células alvo e são menos susceptíveis à metabolização e excreção (COOKE;

HADDAD, 1989). Evidências sugerem que somente parte da fração não ligada entra nas células para ser metabolizada ou exercer seu efeito (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005).

A vitamina D regula aproximadamente 3% do genoma humano (HOLICK, 2007), sendo sua ação similar a outros hormônios esteroidais; ela atua através do receptor para a vitamina D (RVD), que pertence a uma superfamília de receptores nucleares de hormônios como os hormônios esteróides e os tireoidianos. O RVD possui um domínio N-terminal ligado ao DNA e um domínio ligante C-terminal, sendo que a interação da 1,25-dihidroxitamina D3 com a região C-terminal induz a heterodimerização do RVD com o receptor retinóico X (RXR). Posteriormente, o heterodímero RVD-RXR se liga às sequências específicas de DNA conhecidas como elementos de resposta à vitamina D (ERVD) em regiões promotoras de genes responsivos a esta vitamina. Dependendo do alvo, há ativação ou repressão da transcrição mediada pela RNA polimerase II, sendo este processo auxiliado por co-reguladores (BAEKE et al., 2010b; BIKLE, 2009; MCKENNA; LANZ; O'MALLEY, 1999; RACHEZ; FREEDMAN, 2000). Embora seu mecanismo não esteja totalmente esclarecido, a vitamina D também atua de forma não genômica por meios de receptores de superfície celular, como por exemplo, no duodeno, onde ela estimula o movimento vesicular do cálcio do lúmen para a superfície basolateral em minutos (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005; NEMERE; YOSHIMOTO; NORMAN, 1984), e em condrócitos, onde a 1,25-dihidroxitamina D3 altera a produção de prostaglandina e a atividade da protease que leva à calcificação e alteração da matrix óssea (BOYAN et al., 1994).

A vitamina D é um hormônio essencial para a interação entre intestino, rins, paratireóide e os ossos, mantendo assim o fino controle dos níveis de cálcio extracelular, a integridade óssea e os processos fisiológicos celulares normais. Ela atua no sistema endócrino, regula o sistema imune e regula a diferenciação e proliferação celular. Provavelmente desempenha papel protetor contra diversos tipos de câncer; suprimindo o crescimento celular através da estimulação e estabilização de proteínas inibidoras da divisão celular como a

p21 e p27 e contribuindo para regular a apoptose (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005).

Vitamina D e sistema imune

A 1,25(OH)₂ D₃ é um hormônio modulador do sistema imune, sendo que quase todas as suas células apresentam RVDs, incluindo neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativos (PROVVEDINI et al., 1983; TAKAHASHI et al., 2002). A 1- α -hidroxilase é encontrada em DCs, macrófagos, linfócitos T e B, sugerindo que tenha efeito autócrino (CHEN et al., 2007; EDFELDT et al., 2010; MONKAWA et al., 2000; SIGMUNSDOTTIR et al., 2007). Células T *naïve* e em repouso apresentam baixos níveis de RVD; quando ativadas, a expressão destes receptores aumenta. Por outro lado, macrófagos e células dendríticas apresentam menor sensibilidade ao calcitriol quando maduras (BAEKE et al., 2010a, 2010b; MAHON et al., 2003; PROVVEDINI et al., 1983).

Células essenciais para o sistema imune inato, monócitos e macrófagos, atuam na primeira linha de defesa contra agentes agressores, pois apresentam a habilidade de reconhecer PAMPs através de PRR, principalmente pelos receptores *toll-like* (TLR). A ativação de TLR leva à produção de peptídeos antimicrobianos e de ROS para eliminar o microrganismo invasor. TLR estimula a expressão dos RVDs que ativados pela 1,25-dihidroxitamina D₃ induzem a transcrição de genes antimicrobianos (EDFELDT et al., 2010; LIU et al., 2006; WANG et al., 2004). A 1,25-dihidroxitamina D₃ também induz a expressão do CD14 (WANG et al., 2004), correceptor do TLR7 e TLR9 (BAUMANN et al., 2010). Ela estimula os efeitos antimicrobianos de macrófagos e monócitos. Além disso, aumenta a quimiotaxia e a capacidade de fagocitose de células do sistema imune inato, ativa diretamente a transcrição de peptídeos antimicrobianos como a defensina β 2 e o peptídeo antimicrobiano catelicidina (hCAP18) (BAEKE et al., 2010b); a exposição à vitamina D também induz a síntese destes peptídeos em células mielóides, queratinócitos, neutrófilos e células epiteliais dos brônquios (GOMBART; BORREGAARD; KOEFFLER, 2005; GOMBART et al., 2007; WANG et al., 2004; YIM et al., 2007).

Estudos sugerem que a vitamina D aumenta a capacidade antimicrobiana de macrófagos por estimular a geração de EROs via NADPH oxidase, mediado pela fosfatidil inositol 3-quinase (SLY et al., 2001). Há trabalhos controversos sobre o papel da vitamina D sobre a enzima iNOS (*inducible nitric oxide synthase*). Rockett et al, (1998) sugere que a vitamina D induz esta enzima contribuindo para aumentar a capacidade antimicrobiana de macrófagos, enquanto Chang et al, (2004) sugere que a 1,25-dihidroxitamina D3 inibe a iNOS de macrófagos e confere proteção a essas células contra o excesso de produção de radicais livre em pacientes com tuberculose. Em macrófagos alveolares, a 1,25-dihidroxitamina D3 atenua a expressão da iNOS, indicando que este hormônio poderia ser um novo agente terapêutico contra a asma (ZHOU; ZHOU; WANG, 2008).

Células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígenos profissionais, componente fundamental para resposta imune adaptativa; elas capturam, processam e apresentam antígenos para as células T. A 1,25-dihidroxitamina D3 inibe a expressão de superfície de MHC-II complexada com antígeno, de moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86 em DCs (PEDERSEN et al., 2009; PENNA; ADORINI, 2000). A 1,25-dihidroxitamina D3 inibe a expressão de IL-12, IL-23, principais citocinas responsáveis por direcionar as repostas Th1 e Th17, respectivamente, e estimula a produção de IL10 (PEDERSEN et al., 2009; PENNA; ADORINI, 2000). Portanto, a 1,25-dihidroxitamina D3 altera o perfil de resposta de células T, inibindo a produção de citocinas Th1, (IL-2 e TNF- α), e TH-17, (IL-17 e IL21) e estimulando a produção de IL-4, IL-5, IL-10; a 1,25-dihidroxitamina D3 também favorece o desenvolvimento de células Treg por modular células dendríticas, bloqueia a diferenciação e a proliferação de células B e a produção de IgM e de IgG (BOONSTRA et al., 2001; CHEN et al., 2007; JEFFERY et al., 2009; MAHON et al., 2003).

Papel da vitamina D na resposta imune contra o HCV

A vitamina D tem papel fundamental para modulação da resposta imune. Macrófagos, linfócitos, células dendríticas entre outras apresentam receptor para vitamina D (RVD) e a enzima 1- α -hidroxilase, enzima

responsável pela segunda hidroxilação da 25-hidroxivitamina D (BAEKE et al., 2010b). Na resposta inata, fase inicial de resposta ao HCV, a 1,25 dihidroxivitamina D₃ estimula os monócitos e outras células a produzirem catelicidina (LIU et al., 2006), molécula que exibe atividade antiviral contra vírus envelopados (BERGMAN et al., 2007) e aumenta a *quiomiotividade* e capacidade de fagocitar dos macrófagos (XU et al., 1993). Na resposta imune adaptativa, a 1,25 dihidroxivitamina D₃ estimula a produção de células Treg (BOONSTRA et al., 2001; PRIETL et al., 2010), ou seja, as células associadas a menor dano hepático, assim como inibe as células T na produção de citocinas inflamatórias IL17, IL21 e IFN- γ (JEFFERY et al., 2009). Nas células dendríticas, ela também diminui os níveis de MCH II (Penna, 2000), estimula a liberação de IL10, citocina antiinflamatória, inibe a expressão de IL12 e provavelmente também diminui a expressão de IL23, citocinas responsáveis respectivamente pela diferenciação de células Th1 e Th17 (BAEKE et al., 2010b; PEDERSEN et al., 2009), sendo que as duas últimas linhagens de células podem aumentar o dano hepático.

Vitamina D e seu papel antioxidante

A vitamina D₂ (ergocalciferol), a pró-vitamina D₃ (7-deidrocolesterol), a vitamina D₃ (colecalfiferol) e o metabólito ativo 1,25-dihidroxivitamina D₃ inibem a peroxidação lipossomal de lipídeos dependentes de ferro. A vitamina D tem capacidade antioxidante que pode ser importante para a proteção aos lipídeos das membranas de células normais contra o dano oxidativo (WISEMAN, 1993).

Vitamina D e HCV

Níveis normais de vitamina D são associados com menos inflamação e menor grau de fibrose em pacientes com HCV (GEROVA et al., 2014). Entretanto, vários autores encontraram baixos níveis de vitamina D nestes pacientes (ABU-MOUCH et al., 2011; LADERO et al., 2013; PETTA et al., 2010; TERRIER et al., 2012); Gal-Tanamy et al. (2011) demonstraram *in vitro* que a vitamina D atua diretamente como um agente antiviral inibindo a reprodução do HCV no hepatócitos e alta taxa de resposta ao vírus é observado em paciente que tem suplementação de vitamina D.

Os níveis basais de vitamina D e resposta sustentada ao HCV com a terapia combinada de interferon- α peglilato e ribavirina mostraram resultados controversos. Alguns destes trabalhos encontraram associação independente entre os níveis basais de 25-hidroxivitamina D3 e resposta virológica sustentada (RVS) em genótipos 1, 4 e 5 (BITETTO et al., 2011; PETTA et al., 2010; WEINTRAUB et al., 2012) e genótipos 2 e 3 (LANGE et al., 2011), enquanto outros trabalhos não encontraram esta associação (GRAMMATIKOS et al., 2014; KITSON et al., 2013; LANGE et al., 2012); Kitson et al. (2013) realizaram revisão sistemática e meta-análise onde não houve associação entre níveis basais de 25-hidroxivitamina D e RVS com a terapia combinada de interferon- α peglilato e ribavirina, independentemente do genótipo. Por outro lado, Garcia-Álvarez et al. (2014) realizaram meta-análise onde foi relatado que os baixos níveis de vitamina D estão associados com alta probabilidade de diagnóstico de fibrose hepática avançada e à baixas taxas de alcançar RVS com a terapia combinada de interferon- α peglilato e ribavirina, independentemente do genótipo.

Há controvérsias mesmo entre os resultados de suplementação com vitamina D e RVS. Esmat et al. (2015) não encontraram relação entre suplementação de vitamina D3 (15000 UI/semana) e RVS em pacientes com genótipo 4. Segundo Ladero et al. (2013), a suplementação por 5-7 semanas de vitamina D não proporcionou redução na replicação viral. Bitetto et al. (2011) encontraram associação entre suplementação de vitamina D3 (800UI/dia) e RVS, independentemente do genótipo. Abu-mouch et al. (2011) relataram melhora na resposta sustentada ao vírus com suplementação de vitamina D3 (2000 UI/dia) em paciente *naïve* de tratamento com genótipo 1. Nimer e Mouch (2012) verificaram melhora na resposta sustentada ao vírus com suplementação de vitamina D3 (2000 UI/dia) em paciente *naïve* de tratamento com genótipo 2 e 3. Yokoyama et al. (2014) mostraram que a suplementação de vitamina D (1000 UI/dia) associada com a terapia combinada de interferon- α peglilato e ribavirina aumenta a taxa de resposta em 24 semanas ao HCV genótipo 1b e sugere que a suplementação pode ser efetiva no tratamento destes pacientes.

JUSTIFICATIVA

A hepatite C é uma doença viral crônica de difícil tratamento com taxas de resposta virológica sustentada ainda desapontantes, mesmo com uso da medicação de primeira escolha. A grande heterogeneidade da resposta ao tratamento se deve a diversos fatores, incluindo as alterações metabólicas e deficiência de vitamina D. São escassos, até o presente momento, estudos na literatura que tenham avaliado a frequência de hipovitaminose D em pacientes infectados cronicamente pelo HCV. Além disso, não são de nosso conhecimento, até o momento, estudos que tenham verificado a associação da hipovitaminose D com os marcadores de estresse oxidativo em pacientes com HCV. Essas informações podem ser úteis para o entendimento da fisiopatologia da infecção pelo HCV, e fornecer dados para possíveis estudos que investiguem terapias complementares aos antirretrovirais com vitamina D e outros antioxidantes.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Analisar a associação entre os níveis de vitamina D com os marcadores do estresse oxidativo e com as alterações metabólicas em pacientes infectados pelo HCV, atendidos em Londrina e região.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (CAAE 01116612.0.0000.5231, Parecer n. 4257/2012) (Anexo 1). Todos os indivíduos convidados foram informados em detalhes sobre a investigação, e de forma voluntária e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2).

Delineamento do Estudo

Indivíduos

Foram avaliados 58 pacientes com diagnóstico de infecção crônica pelo HCV acompanhados pelo Ambulatório de Hepatite do Ambulatório de Especialidades do Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade

Estadual de Londrina (UEL). O grupo controle foi composto por 89 doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina, atendidos entre junho de 2012 a julho de 2014. Os indivíduos foram controlados por sexo, etnia, idade, IMC, tabagismo e consumo de álcool.

Critérios de inclusão e exclusão para os pacientes

Foram incluídos pacientes adultos, ambos os sexos, com diagnóstico de HCC em tratamento ou não com antiviral. Foram excluídos pacientes com outras doenças infecciosas virais, como a infecção pelo HIV e hepatite por vírus B (HBV), que podem interferir no resultado do estudo.

Critérios de inclusão e exclusão para os controles

Foram incluídos doadores de sangue, com idade entre 18 a 60 anos, de ambos os sexos, com resultado não reagente para todos os testes sorológicos realizados na triagem de doadores de sangue, como anticorpos contra o HIV (anti-HIV), anticorpos contra o HCV (anti-HCV), antígeno de superfície do HVB B (HBsAg), anticorpos contra o antígeno *core* do HBV (anti-HBc), anticorpos contra o vírus linfotrópico de células T humanas tipos I e II (anti-HTLV I/II), anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* e teste não treponêmico para sífilis (VDRL).

Medidas antropométricas e de pressão arterial

O peso corporal foi medido na graduação 0,1 kg, usando uma balança eletrônica, na parte da manhã, com pessoas vestindo roupas leves e sem sapatos. A altura foi medida com uma aproximação de 0,1 cm usando um estadiômetro. O índice de massa corporal foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado. Três aferições de pressão sanguínea foram feitas com um minuto de intervalo entre elas. A média destas medições foi utilizada na análise de dados. Considerou-se o uso de medicação anti-hipertensiva como uma indicação de pressão arterial elevada.

Biomarcadores bioquímicos e imunológicos

Após jejum de 12 horas, os indivíduos foram submetidos à coleta de sangue periférico com e sem anticoagulante EDTA. As amostras foram identificadas consecutivamente por número para garantir a confidencialidade. As amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por 15 min separando o buffy coat, o plasma e o soro que foram aliquoteados e armazenados a -80° C até o momento da análise, quando não realizadas no mesmo dia da coleta.

Foram avaliados os níveis de enzimas hepáticas como aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (γ GT), glicose, colesterol total (CT), colesterol lipoproteína de alta densidade (HDL-C), colesterol lipoproteína de baixa densidade LDL-C, triglicérides (TG), ácido úrico e ferro por um auto-analisador bioquímico (Dimension AR Dade Dade Behring, Deerfield, IL, EUA), segundo as instruções e valores de referência do fabricante. Os níveis séricos de ferritina foi determinado por imunoenensaio de micropartícula por quimiluminescência (Architect, Laboratório Abbott, Abbott Park, IL, EUA).

Índice de proporção aminotransferase e plaquetas (APRI)

APRI é um índice simples, é a relação entre o nível de AST e a contagem de plaquetas que pode prever fibrose significativa (com área sob ROC = 0,88) e cirrose (com área sob ROC = 0,94) em pacientes hepatite C crônica virgens de tratamento com alto grau de precisão. A APRI é calculado como $AST / \text{plaquetas} \times 100$. Com APRI de 0,50 ou menos, 85% dos pacientes não apresentam fibrose significativa e 88% dos pacientes com APRI superior a 1,50 apresentam fibrose significativa. Com APRI de 1,00 ou menos, 98% não apresentam cirrose e com valores de APRI maiores do que 2,0, 57% apresentam cirrose significativa (WAI et al., 2003)

Determinação dos Níveis séricos de vitamina D

A 25 hidroxivitamin D foi realizada por imunoenensaio de micropartículas por quimiluminescência (ARCHITECT®, Abbott Laboratory, Abbot Park, IL, USA). De acordo com os níveis séricos de vitamina D os grupos foram classificados em: níveis adequados $>30\text{ng/mL}$ (MANDORFER et al., 2013).

Determinação da Carga Viral e Genótipo

A carga viral (HCV-RNA) dos pacientes foi realizada pela metodologia de reação em cadeia da polimerase (PCR) por transcriptase reversa quantitativa utilizando o equipamento COBAS AMPLICOR (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ). A genotipagem foi realizada por PCR pela amplificação da região do core viral. Esses dados foram obtidos pela consulta ao prontuário médico.

Biomarcadores de estresse oxidativo

Para avaliar o estresse oxidativo, amostras de sangue periférico foram coletadas com EDTA como anticoagulante. Todas as amostras foram imediatamente centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos o plasma e alíquotas de soro foram armazenadas congeladas a -80°C até à sua utilização. As amostras foram identificadas pelo número consecutivamente para garantir a confidencialidade.

Avaliação do Estresse Oxidativo

Quimiluminescência Induzida por t-Butil Hidroperóxidos (CL-LOOH)

CL-LOOH no plasma foi avaliada baseado como descrito anteriormente por Flecha *et al.* 1991. CL-LOOH é utilizado para mensurar hidroperóxidos lipídicos originados da ação de radicais livres sobre ésteres de colesterol, fosfolipídeos e ácidos graxos livres. CL-LOOH é considerado muito mais sensível e específico do que a medição por TBARS, o método usual para determinar a oxidação lipídica. Os resultados foram expressos de duas maneiras: como média das leituras de uma hora, a qual reflete os níveis de hidroperóxidos de lípidos pré-formadas na amostra (LOZOVY et al., 2011) e como curva, o que demonstra a cinética reação no mesmo período (SIMÃO et al, 2006;.. SIMÃO et al, 2008). Os valores foram expressos como unidades de luz relativa. A mistura da reação incluía 125 μL de plasma, 865 μL de tampão fosfato dissódico (Na_2HPO_4) a 20 μM (pH 7,4) e 20 μL de tert-butil hidroperóxido a 20 μM . CL-LOOH foi medida em luminômetro GloMax® 20/20 Luminometer durante uma hora.

Determinações de Produtos Avançados da Oxidação Protéica (AOPP)

AOPP foi determinada no plasma, utilizando o método descrito por semi-automatizado Witko-Sarsat *et al.* 1998. Produtos avançados da oxidação protéica resulta da oxidação de resíduos de aminoácidos, tais como a tirosina, que conduzem à formação de produtos dityrosine detectados por espectrofotometria. As concentrações de AOPP foram expressas como micromoles por litro ($\mu\text{mol} / \text{L}$) de equivalentes de cloramina-T.

Proteínas Carbonílicas

Produtos contendo grupamentos carbonílicos são formados durante a oxidação de aminoácidos. A determinação de grupamentos carbonílicos estimativa o dano oxidativo às proteínas plasmáticas (REZNICK; PACKER, 1994). Para mensurar os grupamentos alíquotas de plasma foram incubadas em gelo com dinitrofenilhidrazina e desproteinizado em ácido acético trichlorico. Após centrifugação, a amostra foi tratada com uma solução de etanol / água (1: 1). Os precipitados finais foram dissolvidos em guanidina e incubados durante 24 h a 37 °C. O teor de carbonila foi obtido em espectrofotometro (355-390 nm). Os picos obtidos foram utilizados para calcular a concentração de carbonila usando um coeficiente de extinção molar de $22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em $\text{nmol} / \text{L} / \text{mg}$ de proteína total (MILLER., 1959).

Índice de estresse oxidativo (IEO)

Relação entre parâmetros pró-oxidante (AOPP) com antioxidantes (TRAP) determinou a IEO.

Determinação da Capacidade Antioxidante Total plasma (TRAP – *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*)

A capacidade antioxidante total do plasma foi determinada pelo método TRAP. Nesta análise, avalia-se a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes no soro que resulta em um parâmetro integrado capaz de revelar alterações do equilíbrio redox existente *in vivo* (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Nesta técnica quantificam-se antioxidantes hidro e lipossolúveis presentes no plasma, por meio de quimiluminescência, como descrito previamente

(REPETTO et al, 1996). O método baseia-se no princípio da adição de um azoiniciador ao plasma, substância capaz de gerar radicais livres que, por sua vez, são neutralizados pelos antioxidantes presentes no plasma, o período no qual a oxidação é inibida é comparado ao tempo de inibição obtido pelo Trolox® (New Jersey, EUA). O Trolox®, análogo hidrossolúvel da vitamina E, é usado como antioxidante de referência e é quantitativamente relacionado à capacidade antioxidante total do plasma. Os valores de TRAP foram expressos em μM Trolox (VASCONCELOS et al., 2007).

Determinação dos metabólitos do óxido nítrico (NOx)

Os metabólitos de óxido nítrico do soro foram avaliados pela concentração nitrito (NO_2) e nitrato (NO_3) de acordo com a reação de Griess onde há redução de nitrato a nitrito catalisado com cádmio e mensurado por espectrofotometria (GUEVARA et al. 1998).

Análise Estatística

Distribuição de gênero, etnia e tabagismo foram analisados pelo teste do qui-quadrado. As comparações entre os indivíduos do grupo controle e pacientes HCV foram realizadas utilizando o teste de Mann-Whitney e os dados foram expressos como a mediana e intervalo interquartil (25% -75%). As correlações foram avaliadas pela correlação de Spearman. Todos os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. O programa de análise estatística (Graph Pad Prism Versão 4.0) foi usado para as avaliações. Para determinar quais parâmetros de estresse oxidativo foram associados independentemente com a hipovitaminose D, as variáveis que apresentaram $p < 0,10$ na análise univariada foram incluídas no modelo de regressão logística multivariada. As análises multivariadas foram avaliadas pela GraphPad InStat versão 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos no artigo científico submetido na revista *Nutrition Research* e descrito abaixo. As normas para publicação constam no anexo III.

THE PROFILE OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IS DEPENDENT ON
VITAMIN D LEVELS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS

Jorge Paulo Sales de Almeida^a, Lucas Silva Liberatti^a, Fernanda Esteves Nascimento Barros^b,
Ana Paula Kallaur^a, Edna Maria Vissoci Reiche^a, Marcell Alysson Batisti Lozovoy^a, Isaias
Dichi^c, Andrea Name Colado Simão^a

^aDepartment of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center,
University of Londrina;

^bDepartment of Infectology, Health Sciences Center, University of Londrina, Londrina;

^cDepartment of Internal Medicine, Health Sciences Center, University of Londrina; Paraná,
Brazil.

Correspondence author: Dra. Andréa Name Colado Simão, Department of Pathology, Clinical
Analysis, and Toxicology, Health Sciences Center, University Hospital, State University of
Londrina, Av. Robert Koch 60, Vila Operária, CEP 86038-350, Londrina, Paraná, Brazil;
phone: 55-43-3371-2321, FAX: (55) 43-3371-2619 E-mail: deianame@yahoo.com.br

Abbreviation list

AGEs - advanced glycation end-products

ALT - alanine aminotrasferase

AOPPs - advanced oxidation protein products

APRI - Aminotransferase-to-platelet ratio index

AST - aspartate aminotransferase

BMI - body mass index

CL-LOOH - tert-butyl hydroperoxide initiate chemiluminescence

EDTA - ethylenediamine tetraacetic acid

GGT - gamma glutamiltransferase

HCV - Hepatitis C virus

NO - nitric oxide

NO₂⁻ - nitrite

NO₃⁻ - nitrate

OSI - Oxidative Stress Index

RT-PCR - transcriptase reverse polymerase chain reaction

TRAP - total radical-trapping antioxidant parameter

Abstract

Although vitamin D deficiency can change liver injury progression in HCV patients, the main molecular mechanisms involved are largely unknown. The first aim of this study was to evaluate the association between oxidative stress and hypovitaminosis D in patients with HCV. A second objective was to verify if oxidative stress is evolved in the molecular mechanisms related to liver injury. The study included 147 subjects: 89 controls and 58 HCV patients (Vit D <30, n=32 and vit D >30, n=26). Patients with HCV and hypovitaminosis D presented significantly higher aminotransferase-to-platelet ratio index (APRI) ($p=0.0464$) and viral load ($p=0.0426$) compared to the patients with HCV without hypovitaminosis D. Regarding oxidative stress, HCV patients with hypovitaminosis D had higher advanced oxidation protein products (AOPP) ($p=0.0409$), nitric oxide metabolites ($p=0.0206$) levels and oxidative stress index (OSI) ($p=0.0196$), whereas total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) ($p=0.0446$) levels were significantly lower than HCV patients without hypovitaminosis D. Vitamin D in HCV patients showed inverse correlations with levels of iron ($r= -0.407$, $p= 0.0285$), ferritin ($r= -0.383$, $p=0.0444$), APRI ($r= -0.762$, $p= 0.0280$) and γ glutamyl transpeptidase ($r= -0.453$, $p=0.0154$) and also with plasma lipid hydroperoxides levels ($r= -0.426$, $p= 0.0189$). In conclusion, vitamin D insufficiency contributes to the inflammatory process and oxidative stress imbalance in patients with HCV. The profile of oxidative stress markers in HCV patients depends on vitamin D levels, which probably change intracellular signaling pathways and increase inflammation and liver injury.

Keywords: hepatitis C virus, vitamin D, oxidative stress, liver injury markers, iron metabolism

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is one of the main causes of chronic liver disease worldwide, and it has reached a pandemic spread [1]. HCV is a non-cytopathic virus that enters the liver cell and undergoes replication causing cell necrosis by several mechanisms including immune-mediated cytolysis. In addition, it provokes various other phenomena, such as hepatic steatosis, oxidative stress and insulin resistance [2].

There is a marked increase in oxidative stress in HCV infection due the direct action of structural and non-structural components of the virus [3]. Besides, patients with HCV present iron overload and increased ferritin [4], which can further increase oxidative stress and liver injury [5].

Vitamin D deficiency is one of the most prevalent micronutrient deficiencies worldwide, and the rate of this deficiency is estimated to be 30-50% [6]. A growing number of studies reveal pleiotropic roles of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ beyond bone and calcium metabolism, including the induction of antimicrobial genes and the reduction of inflammation and fibrogenesis [6]. Vitamin D has been recently investigated in the setting of chronic liver disease and several immunopathological processes has been reported, such as modulation of transcription of over 200 genes involved in immune response, inflammation, cell differentiation, and fibrogenesis [7]. Experimental and clinical studies suggest that vitamin D deficiency is a risk factor in HCV-infected patients and that its supplementation might protect against liver disease progression and improve response to treatment [8,9].

A growing body of evidences suggest that vitamin D may have a protective role against oxidative stress in the liver [10]. Although there are still limited data on antioxidant properties of vitamin D, some studies have considered its antioxidant potential to be even stronger than vitamin E and melatonin [11,12]. However, to date, few studies have demonstrated the effect of vitamin D deficiency on oxidative stress [13,14].

Although vitamin D deficiency can change liver injury progression in HCV patients, the main molecular mechanisms involved are largely unknown. Furthermore, we are not aware, to date, of any study, which has verified the association between hypovitaminosis D and oxidative stress in HCV patients. To evaluate the redox state of a determined pathological condition, it is necessary to use a robust and complete methodological approach. In this context, an interpretation of the several methods will allow a better understanding of the oxidative phenomena that occur [15]. Therefore, the first aim of this study was to evaluate the association between oxidative stress and hypovitaminosis D in patients with HCV. A second objective was to verify if oxidative stress is involved in the molecular mechanisms related to liver injury.

2. Patients and Methods

The Institutional Research Ethics Committees of the University of Londrina approved the protocol. All invited individuals were informed in detail about the research and a voluntary written consent form was obtained from 58 HCV patients and 89 healthy volunteers enrolled consecutively in the study. HCV and control groups were matched for age, gender, ethnicity, smoking and body mass index (BMI). After that, HCV group was divided in patients with hypovitaminosis D (Vit D <30, n=32) and without hypovitaminosis D (vit D >30, n=26). Healthy individuals from the same geographic area composed the control group. All HCV patients were seropositive for HCV antibodies and HCV RNA viral load. Patients with concurrent hepatitis B virus or human immunodeficiency virus (HIV) infections or autoimmune hepatitis evidence were excluded. None of the participants in the study presented clinical or laboratorial characteristics of malabsorption syndrome, autoimmune, chronic infection, renal, heart, oncological disease or iron deficiency anemia, and none were receiving corticosteroids, vitamin D, antioxidant supplements or drugs for iron deficiency anemia. All individuals enrolled in the study did not drink alcohol or practiced physical activity regularly.

2.1. Anthropometric Measurements

Body weight was measured to the nearest 0,1 kg by using an electronic scale, with individuals wearing light clothing, but no shoes, in the morning; height was measured to the nearest 0,1 cm by using a stadiometer. Body mass index was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared.

2.2. Biochemical and Immunological Biomarkers

After fasting for 12 hours, the patients underwent the following laboratory blood analysis: iron, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyltransferase (GGT) and uric acid which were evaluated by a biochemical auto-analyzer (Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA), using Dade Behring® kits. The platelet were counted using Cell-Dyn 3700 (Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Ferritin and 25-hydroxyvitamin D3 levels were determined by chemiluminescence microparticle immunoassay (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). RNA-HCV viral load of patients was carried out using quantitative transcriptase reverse polymerase chain reaction (RT-PCR) with COBAS AMPLICOR (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ). HCV genotyping was assayed using PCR by amplifying the viral core genome region.

2.3. Aminotransferase-to-platelet ratio index

Aminotransferase-to-platelet ratio index (APRI) is a simple index, consisting of two readily available laboratory results aspartate aminotransferase (AST) level and platelet count that can predict significant fibrosis (with area under ROC = 0.88) and cirrhosis (with area under ROC = 0.94) in treatment-naïve chronic hepatitis C patients with a very high degree of accuracy. The APRI was calculated as $(AST/\text{upper limit of normal range})/\text{platelet count } (10^9/L) \times 100$. For patients with APRI of 0.50 or less, 85% would not have significant fibrosis and for

patients with APRI greater than 1.50, 88% of the patients would have significant fibrosis. For patients with APRI of 1.00 or less, 98% would not have cirrhosis and for patients with APRI greater than 2.0, 57% had significant cirrhosis [16].

2.4. Oxidative Stress Biomarkers

For oxidative stress evaluation, peripheral blood samples were collected with EDTA as anticoagulant. All samples were immediately centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes and plasma and serum aliquots were stored at freezer -80°C until use.

2.5. Analysis of tert-Butyl-Hydroperoxide-Initiated Chemiluminescence

Analysis of tert-Butyl-Hydroperoxide-Initiated Chemiluminescence (CL-LOOH) in plasma was evaluated as described previously by Flecha *et al.* [17] and reported previously by our group [18]. CL-LOOH is used to measure lipid hydroperoxides originating from phospholipids, cholesterol esters, protein, and free fat acid oxidation and decreased antioxidants levels, brought about by previous free radical action mainly on plasma lipoprotein particles. This test is based on the assumption that an increase in CL is related to the oxidative stress previously suffered by the tissue, inducing the consumption of antioxidant defenses such as vitamin E and the formation of lipoperoxides resulting in an increase in photon emission. Differences in the curve inclination reflect differences in the amount of antioxidants in a sample, whereas higher photon emission levels reflect higher amount in hydroperoxides previously produced in a sample [19]. Thus, the results were expressed by two different manners: a) as a mean of the readings performed after one-hour reaction, which reflects lipid hydroperoxide levels pre-formed in a sample and expressed as relative light unit RLU [18]; b) as a curve, which demonstrates the kinetic reaction at the same period [19,20].

2.6.Determination of Advanced Oxidation Protein Products

Determination of Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) was determined in the plasma using the semiautomated method described by Witko-Sarsat *et al.* [21]. AOPP results in the oxidation of amino acid residues such as tyrosine, leading to the formation of dityrosine containing protein cross-linked products detected by spectrophotometry [18,21,22]. AOPP concentrations were expressed as micromoles per liter ($\mu\text{mol/L}$) of chloramine-T equivalents.

2.7.Determination of carbonyl protein

Carbonyl content was measured as estimative of oxidative injury to plasmatic proteins [23]. Plasma aliquots were incubated on ice with dinitrophenylhydrazine and deproteinized in trichloric acetic acid. After centrifugation, the pellets were treated with an ethanol/water solution (1:1). The final precipitates were dissolved in guanidine, incubated during 24 h at 37 °C and the carbonyl content calculated by obtaining sample spectra at 355–390 nm of samples. The obtained peaks were employed to calculate carbonyl concentration using a molar extinction coefficient of 22 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Results were expressed in nmol/L/mg total protein content [24].

2.8.Determination of Nitric Oxide Metabolites

Serum Nitric Oxide Metabolites (NO_x) were assessed by nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) concentration according to the Griess reaction supplemented with the reduction of nitrate to nitrite with cadmium [25].

2.9.Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter

Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter (TRAP) was determined as reported previously by [26]. Briefly, this method detects hydrosoluble and/or lyposoluble plasma antioxidants by measuring the chemiluminescence inhibition time induced by 2,2-azobis (2-amidinopropane). The system was calibrated with the vitamin E analog Trolox and TRAP values were expressed in equivalent of μM Trolox/uric acid (mg/dL).

2.10. Oxidative Stress Index

Relation between pro-oxidant (AOPP) and antioxidant (TRAP) parameters was determined by Oxidative Stress Index (OSI).

2.11. Statistical Analysis

Distribution of gender, ethnicity, and smoking was analyzed by chi-square test. Comparisons between control subjects and HCV patients were performed using the Mann-Whitney test and data were expressed as the median and interquartile range (25%-75%). Correlations were evaluated by Spearman's rank correlation. All the results were considered significant when $p < 0.05$. A statistical analysis program (Graph Pad Prism version 4.0) was used for evaluations. To determine which oxidative stress parameters were independently associated with hypovitaminosis D, the variables that presented $p < 0.10$ in the univariate analyses were included in the multivariate logistic regression model. The multivariable analyses were evaluated by the GraphPad InStat version 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3. Results

HCV patients and control subjects did not show statistical differences in age, sex, ethnicity and BMI. HCV patients showed statistically significant lower ($p=0.0470$) vitamin D levels than controls. As expected, HCV patients presented higher ($p<0.0001$) AST, ALT, GGT, iron, and ferritin levels compared to the control group (Table 1). With regard to oxidative stress, HCV patients had higher levels of hydroperoxides (0.0088), carbonyl protein ($p=0.0013$), Nox ($p<0.0001$), and OSI ($p=0.0358$), whereas a lower TRAP ($p<0.0001$) was found in relation to the control group (Table 1). Chemiluminescence curve was significantly different ($p<0.0001$) between HCV and control groups (figure 1A). The frequency of 55% hypovitaminosis D (data not shown) was found when HCV patients were divided into two groups, with and without hypovitaminosis D. No differences between age, sex, ethnicity, genotype, disease duration and BMI were observed in HCV patients with or without hypovitaminosis D. Patients with HCV and hypovitaminosis D presented significantly lower AST ($p=0.0293$), ALT ($p=0.0423$) and higher ferritin ($p=0.0481$), APRI ($p=0.0464$) and viral load ($p=0.0426$) compared to the patients with HCV without hypovitaminosis D (table 2).

Regarding oxidative stress, HCV patients with hypovitaminosis D had higher OSI ($p=0.0196$) and AOPP ($p=0.0409$) and Nox ($p=0.0206$) levels (table 3). The chemiluminescence curve also differed ($p<0.0001$) between the groups (figure 1.b). Multivariate analysis showed that lipid hydroperoxides, AOPP and OSI were significantly associated with the presence of hypovitaminosis D (data not shown).

HCV patients with hypovitaminosis D showed inverse correlations between vitamin D and levels of GGT ($r= -0.453$, $p=0.0154$), iron ($r= -0.407$, $p= 0.0285$), ferritin ($r= -0.383$, $p=0.0444$), and APRI ($r= -0.762$, $p= 0.0280$) (table 4) and also with plasma lipid hydroperoxides levels ($r= -0.426$, $p= 0.0189$) (data not shown). Lipid hydroperoxides were directly correlated with AST ($r= 0.510$, $p<0.01$), ALT ($r= 0.338$, $p<0.05$), GGT ($r= 0.401$, $p<0.05$) and iron ($r= 0.4484$, $p<0.05$). AOPP was inversely correlated with AST ($r= -0.367$, $p<0.05$), ALT ($r= -0.360$, $p<0.05$) and directly correlated with GGT ($r= 0.386$, $p<0.05$). OSI was inversely related to APRI ($r= -0.483$, $p<0.05$) (table 4).

4. Discussion

The main finding of the present study was that lower serum 25-hydroxyvitamin D3 was associated to an unfavorable redox state in HCV patients shown by an increase in AOPP, NOx and OSI and a decrease in TRAP. Additionally, lower serum 25-hydroxyvitamin D3 was associated to an enhanced inflammatory process shown by elevated ferritin levels, a positive acute-phase protein, and that liver injury verified by APRI and viral load were also increased in patients with hypovitaminosis D.

The current data are partially in agreement with Petta *et al.* [27], who showed that HCV patients with genotype 1 had low serum levels of 25-hydroxyvitamin D3 possibly because of reduced CYP27A1 expression and low vitamin D was linked to severe fibrosis [27]. Of note, in the present study, APRI median above two in HCV patients with hypovitaminosis D was compatible with cirrhosis prediction.

The core nucleocapsid protein of HCV is the main contributor for increasing oxidative stress in the liver, but other proteins such as NS3 and NS5A are also involved in generating oxidative stress [28,29]. Changes in iron metabolism as well as HCV proteins can contribute to the increase in oxidative stress. In a previous study, our group has reported that HCV patients had increased oxidative stress and that changes in iron metabolism were probably related to these findings [5]. Observations that superoxide can mobilize iron from ferritin led to the suggestion that exposure to ROS may in fact increase the pool of reactive (reduced) iron and exacerbate oxidant injury [30]. Iron is a transition metal that can convert poorly reactive free radicals into highly reactive moieties that can cause oxidative damage to cells and tissues [30,31]. Unbound intracellular ferrous iron is capable of generating free radicals and ROS through Fenton reaction causing lipid peroxidation, DNA breaks, and others forms of cellular damage [32].

We are not aware, to date, of any study, which has related hypovitaminosis D and oxidative stress in HCV patients. Nevertheless, it was reported in severely obese children that lower 25-hydroxyvitamin D3 levels increased inflammation, endothelial activation, and

oxidative/nitrosative stress [13]. A recent study also demonstrated that 25-hydroxyvitamin D3 deficiency intensifies oxidative stress and DNA damage in patients with asthma [14]. In the present study, HCV patients with hypovitaminosis D had an increase in lipid hydroperoxides level, an initial marker of lipid oxidation. Additionally, AOPP and NO_x levels were also enhanced and total antioxidant capacity was decreased in this group. AOPP is derived from oxidation-modified albumin, as well as fibrinogen and lipoproteins. AOPP is formed during oxidative stress by the action of chloraminated oxidants, mainly hypochlorous acid and chloramines, produced by myeloperoxidase in activated neutrophils [21,33]. An increase in AOPP levels indicates oxidative stress and the presence of coexisting inflammation. AOPP is structurally similar to advanced glycation end-products (AGEs) and exert similar biological activities as AGEs, i.e., induction of proinflammatory cytokines and adhesion molecules [21]. In cells, the level of the progressive accumulation of modified proteins reflects the balance between the rate of protein oxidation and the rate of oxidized protein degradation, and is dependent on multiple factors that influence the levels of pro- and antioxidants and the levels of proteases that catalyze the degradation of oxidized protein residues [34]. It is likely that enhanced liver injury propitiates protease liberation and consequently more degradation in oxidized proteins. Although this assumption could justify our findings of inverse correlation between AOPP and transaminases, more studies are needed to confirm this hypothesis.

Meantime, NO_x are produced endogenously by several types of mammalian cells including hepatocytes in response to inflammatory stimuli as a result of upregulation of the inducible form NO synthase (iNOS) [35,36]. NO_x production in chronic viral hepatitis is controversial. Amaro *et al.* [37] reported a decrease in NO_x production in patients with chronic viral hepatitis B and C. Hokari *et al.* [38] reported that serum NO_x concentration in patients with viral hepatitis was not different from that healthy control subjects. In contrast, Tankurt *et al.* [39] reported that serum NO_x concentration was increased in chronic hepatitis C. Our data are in agreement with Tankurt *et al.* [39], which showed increased NO_x levels in HCV group. The discrepancy between studies can be explained by differences in the severity of inflammation and liver injury. Increased NO_x level is explained by the recurrent observation in the liver of HCV-

infected patients of an enhanced iNOS expression, implying an excessive NO_x formation [35,40]. Under conditions of oxidative stress, as seen in certain chronic inflammatory disorders including hepatitis C, NO_x reactive species, such as peroxynitrite and nitrogen oxides, are currently considered the main mediator of the deleterious effects to the host [41].

Our data, which showed inverse correlation between vitamin D levels and lipid hydroperoxides, liver injury markers and APRI, agree with a previous review article by Rahman & Branch [8], in which the authors have reported some studies that demonstrated inverse correlation between vitamin D levels and fibrosis stage. They suggested that those findings could be due to the anti-inflammatory effects of vitamin D. It is conceivable to add from the results of the present study an antioxidant activity besides the anti-inflammatory activity suggested in that previous review. A proposed mechanism to explain the aforementioned effect is that Vitamin D interacts with its nuclear vitamin D receptor protecting against oxidative stress production [42]. This restoration in oxidative stress balance could influence the migration, proliferation, and gene expression of fibroblast [43,44] and reduce the inflammatory and fibrogenic activity of liver stellate cells [45].

Altogether, our data may suggest that the lack of vitamin D anti-inflammatory and antioxidant activity contributes to increase iron metabolism and consequently enhance the oxidative stress in HCV patients with hypovitaminosis D. Reactive oxygen species play an important role in cell signaling and regulate hormone action, growth factors, cytokines, transcription, apoptosis, iron transport, immunomodulation, and neuromodulation [46]. Therefore, it is conceivable to propose that oxidative stress markers modulate intracellular signaling favoring the increase in the inflammatory process and liver injury in patients with hypovitaminosis D.

Although consensus is still missing on optimal 25-hydroxyvitamin D3 target levels and dosing strategie [8], our data showed that vitamin D levels lower than 30 ng/mL are correlated with increased oxidative stress, viral load and APRI in HCV patients.

The present study has some limitations. First, the small number of participants, due to the rigorous inclusion criteria, which were followed; second, liver biopsies were not performed

in all patients, but, this analysis was at least partially substituted by the APRI index. In contrast, as strengths of the study, one may consider that this is the first report that oxidative stress may be involved in the molecular mechanisms, which is found in liver injury in HCV patients with hypovitaminosis D. In addition, this study evaluated several oxidative stress parameters and iron status in HCV patients with and without hipovitaminosis D. This design allowed inferring participation in several physiopathological mechanisms, which accompany liver injury in HCV patients. Thus, the original design and robust methodological approach can be considered the main strength of this study.

In conclusion, vitamin D insufficiency contributes to the inflammatory process and oxidative stress imbalance in patients with HCV. The profile of oxidative stress markers in HCV patients depends on vitamin D levels, which probably change intracellular signaling pathways and increase inflammation and liver injury. More studies are warranted to increase the understanding of the complex molecular pathways involved in oxidative liver injury in patients with HCV.

Contributions

The authors' responsibilities were as follows: JPSA and ANCS collected the data, designed the study, performed the statistical analysis, interpreted the results, and wrote the manuscript, FENB assisted the patients and interpreted the results, APK, EMVR and MABL performed the laboratory tests, and ID interpreted the results and wrote the manuscript.

5. Disclosure

The authors declare that they do not have any conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int* 2009;29 Suppl 1:74–81. doi:10.1111/j.1478-3231.2008.01934.x.
- [2] Irshad M, Dhar I. Hepatitis C virus core protein: an update on its molecular biology, cellular functions and clinical implications. *Med Princ Pract* 2006;15:405–16. doi:10.1159/000095485.
- [3] Irshad M, Mankotia DS, Irshad K. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2013;19:7896–909. doi:10.3748/wjg.v19.i44.7896.
- [4] Metwally MA, Zein CO, Zein NN. Clinical significance of hepatic iron deposition and serum iron values in patients with chronic hepatitis C infection. *Am J Gastroenterol* 2004;99:286–91.
- [5] Venturini D, Simão ANC, Barbosa DS, Lavado EL, Narciso VES, Dichi I, et al. Increased oxidative stress, decreased total antioxidant capacity, and iron overload in untreated patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2010;55:1120–7. doi:10.1007/s10620-009-0833-1.
- [6] Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266–81. doi:10.1056/NEJMra070553.
- [7] Kitson MT, Roberts SK. D-livering the message: The importance of vitamin D status in chronic liver disease. *J Hepatol* 2012;57:897–909. doi:10.1016/j.jhep.2012.04.033.
- [8] Rahman AH, Branch AD. Vitamin D for your patients with chronic hepatitis C? *J Hepatol* 2013;58:184–9. doi:10.1016/j.jhep.2012.07.026.
- [9] Sharifi N, Amani R, Hajiani E, Cheraghian B. Does vitamin D improve liver enzymes, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in adults with non-alcoholic fatty liver disease? A randomized clinical trial. *Endocrine* 2014. doi:10.1007/s12020-014-0336-5.
- [10] Sardar S, Chakraborty A, Chatterjee M. Comparative effectiveness of vitamin D3 and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in sprague - Dawley rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1996;66:39–45.
- [11] Bao B-Y, Ting H-J, Hsu J-W, Lee Y-F. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer* 2008;122:2699–706. doi:10.1002/ijc.23460.
- [12] Tarcin O, Yavuz DG, Ozben B, Telli A, Ogunc AV, Yuksel M, et al. Effect of vitamin D deficiency and replacement on endothelial function in asymptomatic subjects. vol. 94. 2009. doi:10.1210/jc.2008-1212.
- [13] Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Simó-Jordá R, Laporta-Martín P, Carratalá-Calvo A, Alonso-Iglesias E. Vitamin D status is linked to biomarkers of oxidative stress, inflammation, and endothelial activation in obese children. *J Pediatr* 2012;161:848–54. doi:10.1016/j.jpeds.2012.04.046.

- [14] Lan N, Luo G, Yang X, Cheng Y, Zhang Y, Wang X, et al. 25-hydroxyvitamin D3-deficiency enhances oxidative stress and corticosteroid resistance in severe asthma exacerbation. *PLoS One* 2014;9:e111599. doi:10.1371/journal.pone.0111599.
- [15] Lozovoy M a B, Simão a NC, Oliveira SR, Iryioda TM V, Panis C, Cecchini R, et al. Relationship between iron metabolism, oxidative stress, and insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2013;42:303–10. doi:10.3109/03009742.2012.754942.
- [16] Wai C-T, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero J a, Conjeevaram HS, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:518–26. doi:10.1053/jhep.2003.50346.
- [17] Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 1991;10:93–100. doi:10.1016/0891-5849(91)90002-K.
- [18] Lozovoy M, Simão A, Panis C, Rotter M, Reiche E, Morimoto H, et al. Oxidative stress is associated with liver damage, inflammatory status, and corticosteroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2011;20:1250–9. doi:10.1177/0961203311411350.
- [19] Simão ANC, Suzukawa AA, Casado MF, Oliveira RD, Guarnier FA, Cecchini R. Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,2'-Azobis (Amidinopropane). *Life Sci* 2006;78:1202–10. doi:10.1016/j.lfs.2005.06.047.
- [20] Simão ANC, Dichi JB, Barbosa DS, Cecchini R, Dichi I. Influence of uric acid and gamma-glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *Nutrition* 2008;24:675–81. doi:10.1016/j.nut.2008.03.021.
- [21] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;49:1304–13. doi:10.1038/ki.1996.186.
- [22] Post JJ, Pan Y, Freeman AJ, Harvey CE, White PA, Palladinetti P, et al. Clearance of Hepatitis C Viremia Associated with Cellular Immunity in the Absence of Seroconversion in the Hepatitis C Incidence and Transmission in Prisons Study Cohort 2004;189.
- [23] Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994;233:357–63. doi:10.1016/S0076-6879(94)33041-7.
- [24] Miller GL. Protein determination for large numbers of samples. *Anal Chem* 1959;31:964.
- [25] Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 1998;274:177–88. doi:10.1016/S0009-8981(98)00060-6.
- [26] Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 1996;255:107–17.

- [27] 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;51:1158–67. doi:10.1002/hep.23489.
- [28] Pal S, Polyak SJ, Bano N, Qiu WC, Carithers RL, Shuhart M, et al. Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:627–34. doi:10.1111/j.1440-1746.2009.06128.x.
- [29] Bureau C, Bernad J, Chaouche N, Orfila C, Béraud M, Gonindard C, et al. Nonstructural 3 Protein of Hepatitis C Virus Triggers an Oxidative Burst in Human Monocytes via Activation of NADPH Oxidase. *J Biol Chem* 2001;276:23077–83. doi:10.1074/jbc.M100698200.
- [30] Arosio P, Levi S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 2002;33:457–63. doi:10.1016/S0891-5849(02)00842-0.
- [31] Torti FM, Torti S V. Review article Regulation of ferritin genes and protein 2015;99:3505–17.
- [32] Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2009;1790:589–99. doi:10.1016/j.bbagen.2008.09.004.
- [33] Cakatay U. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab* 2005;31:551–7.
- [34] Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJA. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:709–18. doi:10.1016/S0006-291X(03)00809-X.
- [35] Majano PL, GarciaMonzon C, LopezCabrera M, LaraPezzi E, FernandezRuiz E, GarciaIglesias C, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. *J Clin Invest* 1998;101:1343–52.
- [36] Joshi MS, Ponthier JL, Lancaster JR. Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1357–66. doi:10.1016/S0891-5849(99)00179-3.
- [37] Amaro MJ, Bartolomé J, Pardo M, Cotonat T, López-Farré A, Carreño V. Decreased nitric oxide production in chronic viral hepatitis B and C. *J Med Virol* 1997;51:326–31.
- [38] Hokari A, Zeniya M, Esumi H, Ishikawa T, Kurasima Y, Toda G. Role of nitric oxide (NO) in interferon-alpha therapy for hepatitis C. *J Infect* 2005;51:47–53. doi:10.1016/j.jinf.2004.08.025.
- [39] Tankurt E, Kirkali G, Ali Ozcan M, Mersin N, Ellidokuz E, Akpınar HA. Increased serum nitrite and nitrate concentrations in chronic hepatitis. *J Hepatol* 2015;29:512–3. doi:10.1016/S0168-8278(98)80077-9.
- [40] García-Monzón C, Majano PL, Zubia I, Sanz P, Apolinario A, Moreno-Otero R. Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis is associated with

- histological severity of liver disease. *J Hepatol* 2000;32:331–8. doi:10.1016/S0168-8278(00)80080-X.
- [41] Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med* 2000;6:347–73.
- [42] Willheim M, Thien R, Schratlbauer K, Bajna E, Holub M, Gruber R, et al. Regulatory Effects of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ on the Cytokine Production of Human Peripheral Blood Lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3739–44. doi:10.1210/jc.84.10.3739.
- [43] Timms PM, Mannan N, Hitman GA, Noonan K, Mills PG, Syndercombe-Court D, et al. Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: Mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? *QJM - Mon J Assoc Physicians* 2002;95:787–96. doi:10.1093/qjmed/95.12.787.
- [44] Cigolini M, Iagulli MP, Miconi V, Galiotto M, Lombardi S, Targher G. Concentrations and Prevalence of Cardiovascular Disease Among Type 2 2006:722–4.
- [45] 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.
- [46] Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem* 2004;11:1163–82. doi:10.2174/0929867043365323.

TABLE 1 - Demographic, clinical and laboratory data in controls and HCV patients.

Parameters	Controls (n=89)	HCV (n=58)	p
Gender (F/M)	58/31	35/23	NS
Caucasian / not caucasian	52/37	36/22	NS
Age (years)	51.0 (47.0-55.0)	54.0 (46.3-60.0)	NS
BMI (kg/m ²)	25.3 (22.3-28.4)	26.6 (23.7-28.9)	NS
25 (OH) Vit D (ng/mL)	32.65 (29.93-37.10)	27.70 (20.55-27.70)	0.0470
AST (U/L)	22.5 (17.8-43.5)	51.0 933.5-89.8)	<0.0001
ALT (U/L)	36.5 (29.8-43.5)	77.0 (46.5-123.8)	<0.0001
GGT (U/L)	26.0 (21.0-40.0)	80.0 (38.5-141.8)	<0.0001
Iron (mcg/dL)	90.5 (70.3-112.5)	131.0 (95.0-174.5)	<0.0001
Ferritin (ng/mL)	86.6 (34.2-151.1)	257.3 (99.0-490.0)	<0.0001
Hydroperoxide (RLU)	166.7 (141.9-179.0)	180.0 (167.3-221.8)	0.0088
Nox (mM)	30.4 (23.3-55.4)	60.7 (43.6-92.5)	<0.0001
AOPP μ moles/L of chloramine-T equivalents)	152.9 (104.5-206.2)	131.7 (109.5-181.5)	NS
Carbonyl Protein (nmol/mL/mg total proteins)	71.7 (60.0-83.8)	80.7 (71.1-92.6)	0.0013
TRAP (μ M Trolox / UA mg/dL))	177.3 (133.0-200.9)	137.3 (119.8-154.7)	<0.0001
OSI (%)	0.887 (0.518-1.287)	1.210 (0.684-1.536)	0.0358

Chi-square test. Mann-Whitney test. Data are expressed as median (25-75%). M, Male; F, female; BMI, body mass index; ALT, Alanine Aminotransferase; AST, Aspartate Aminotransferase; GGT, Gama-Glutamyltransferase; NOx, Nitric Oxide metabolites; AOPP, Advanced Oxidation Protein Products; TRAP, Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter; UA, uric acid; OSI, Oxidative Stress Index; NS, not significant

Table 2 – Demographic, clinical and laboratory data in HCV patients with and without hypovitaminosis D (<30).

Parameters	Vit D ≥ 30 n=26	Vit D < 30 n=32	p
Gender			
Female	18/8	17/15	NS
Male			
Ethnicity			
Caucasian	15/11	21/11	NS
Not Caucasian			
Genotype			
1	25	31	NS
3	1	1	
Disease Duration (years)	5.5 (2.3-10.8)	3.0 (2.0-10.0)	NS
Age (years)	53.0 (44.5-59.5)	57.0 (49.5-62.0)	NS
BMI (Kg/m ²)	25.92 (23.60-28.97)	26.61 (23.08-28.53)	NS
25(OH) D (ng/mL)	36.10 (34.90-44.13)	22.40 (18.18-25.88)	<0.0001
AST (U/L)	59.0 (49.3-126.3)	50.5 (32,0-75,5)	0.0293
ALT (U/L)	109,5 (73,5-146,3)	65,0 (46,3-124,5)	0.0423
GGT (U/L)	81.5 (31.5-159.0)	76.0 (45.0-182.8)	NS
Iron (mcg/dL)	125,5 (91,8-184,3)	133,0 (108,0-179,0)	NS
Ferritin (ng/mL)	157,2 (67,5-449,4)	291,0 (1507,7-494,2)	0.0481
APRI	0.510 (0.368-0.648)	2.413 (0.516-3.475)	0.0464
VL (copies)	770200 (340300-863300)	1690000 (719000-2062000)	0.0426

Chi-square or Exact Fisher test. Mann-Whitney test. Data are expressed as median (25-75%). Vit D, vitamin D; ALT, Alanine Aminotransferase; AST, Aspartate Aminotransferase; GGT, Gama-Glutamyltransferase; APRI, Aminotransferase-to-platelet ratio index; VL, viral load; NS, not significant; fibrosis: 1,5; cirrhosis: 2,0;

Table 3 – Oxidative stress markers HCV patients with (< 30) and without (> 30) hypovitaminosis D

Parameters	Vit D ≥ 30	Vit D < 30	P
Hydroperoxides (RLU)	179.4 (167.5-222.9)	177.0 (163.7-203.4)	NS
Nox (mM)	49.98 (35.20-73.96)	69.16 (49.96-93.54)	0.0206
AOPP (μmoles/L of chloramine-T equivalentes)	124.9 (101.9-141.4)	147.1 (113.9-202.2)	0.0409
Carbonyl Protein (nmol/mL/mg total proteins)	80.36 (71.67-84.13)	82.86 (70.53-94.08)	NS
TRAP (μM Trolox / UA mg/dL))	138.3 (127.6-151.4)	121.1 (106.1-147.8)	0.0446
OSI	0.838 (0.684-1.263)	1.232 (0.975-1.569)	0.0196

Mann-Whitney test. Data are expressed as median (25-75%). Vit D, vitamin D; NOx, Nitric Oxide metabolites; AOPP, Advanced Oxidation Protein Products; TRAP, Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter; UA, uric acid; OSI, Oxidative Stress Index.

Table 4 – Spearman's correlation between liver and iron metabolism markers and Vit D levels and oxidative stress in HCV patients with hypovitaminosis D

	Vit D	Hidro	AOPP	Carbonyl Protein	NOx	TRAP	OSI
AST (U/L)	-0.213	0.510**	-0.367*	0.027	0.208	-0.132	-0.280
ALT (U/L)	-0.110	0.338*	-0.360*	-0.125	-0.074	-0.070	-0.350
GGT (U/L)	-0.453 **	0.401*	0.386*	-0.147	-0.073	0.050	0.305
Iron	-0.407*	0.448*	0.038	-0.216	-0.0196	-0.173	0.025
Ferritin		0.257	0.232	0.002	-0.026	-0.208	0.264
APRI	-0.762*	0.1255	-0.020	0.3431	0.010	0.176	-0.483*

Data are r (p). * p<0.05; ** <0.01

ALT, Alanine Aminotransferase; AST, Aspartate Aminotransferase; GGT, Gama-Glutamyltransferase; APRI, Aminotransferase-to-platelet ratio index; Hydro, hydroperoxides; AOPP, Advanced Oxidation Protein Products; NOx, Nitric oxide metabolites; TRAP, Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter; OSI, Oxidative Stress Index.

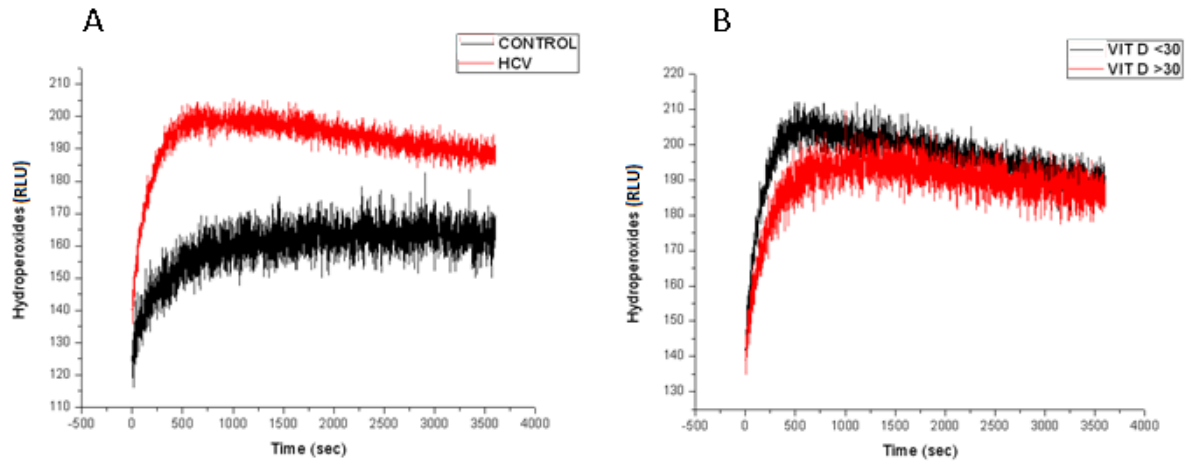


Figure 1: Oxidative stress profile evaluated by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence. A) Controls vs HCV patients, $p < 0.0001$. B) Patients with vitamin D <30 ng/mL and patients with vitamin D >30 ng/mL, $p < 0.0001$. RLU, relative unities light.

CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

- A frequência da hipovitaminose D foi maior em indivíduos infectados pelo HCV que em indivíduos saudáveis;
- Em indivíduos infectados pelo HCV os níveis dos marcadores de lesão hepática e inflamação foram maiores que em indivíduos saudáveis;
- A insuficiência de vitamina D contribui para o desequilíbrio inflamatório e para um perfil redox desfavorável em pacientes com HCV;
- Entre os pacientes com HCV, aqueles com hipovitaminose D apresentaram um pior perfil redox quando comparados com os pacientes sem hipovitaminose D.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou a correlação da hipovitaminose D com a elevação dos marcadores de estresse oxidativo, dos metabólitos de ferro, da carga viral em pacientes com HCV e que a soma destes fatores favorecem o aumento do grau da lesão hepática nestes indivíduos. Este estudo também evidenciou a importância de mensurar o estresse oxidativo com diversas metodologias, com diferentes suposições, porém mais estudos são necessários para aumentar a compreensão vias moleculares envolvidas na lesão hepática em pacientes com hepatite C crônica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, M. Y. et al. Hepatitis C virus-core and non structural proteins lead to different effects on cellular antioxidant defenses. **Journal of medical virology**, v. 76, n. 4, p. 489–97, ago. 2005.

ABU-MOUCH, S. et al. Vitamin D supplementation improves sustained virologic response in chronic hepatitis C (genotype 1)-naïve patients. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 17, n. 47, p. 5184–90, 21 dez. 2011.

ALTER, M. J. et al. Sporadic non-A, non-B hepatitis: frequency and epidemiology in an urban U.S. population. **The Journal of infectious diseases**, v. 145, p. 886–893, 1982.

ALTER, M. J. Review of serologic testing for hepatitis C virus infection and risk of posttransfusion hepatitis C. **Arch Pathol Lab Med**, v. 118, p. 342–345, 1994.

ARNAUD, N. et al. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 10, p. e1002289, out. 2011.

BAEKE, F. et al. Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the immune system. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, p. 221–227, 2010a.

BAEKE, F. et al. Vitamin D: modulator of the immune system. **Current opinion in pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 482–96, ago. 2010b.

BARTOSCH, B.; DUBUISSON, J.; COSSET, F.-L. Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1-E2 Envelope Protein Complexes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 5, p. 633–642, 3 mar. 2003.

BAUMANN, C. L. et al. CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, p. 2689–2701, 2010.

BERGMAN, P. et al. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. **Current HIV research**, v. 5, p. 410–415, 2007.

BIKLE, D. Nonclassic actions of vitamin D. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 94, n. 1, p. 26–34, jan. 2009.

BITETTO, D. et al. Vitamin D supplementation improves response to antiviral treatment for recurrent hepatitis C. **Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation**, v. 24, n. 1, p. 43–50, jan. 2011.

BOONSTRA, A. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Has a Direct Effect on Naive CD4+ T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 9, p. 4974–4980, 1 nov. 2001.

BOWEN, D. G.; WALKER, C. M. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 946–52, 18 ago. 2005.

BOYAN, B. D. et al. Nongenomic regulation of extracellular matrix events by vitamin D metabolites. **Journal of cellular biochemistry**, v. 56, p. 331–339, 1994.

BRAULT, C.; LEVY, P. L.; BARTOSCH, B. Hepatitis C virus-induced mitochondrial dysfunctions. **Viruses**, v. 5, n. 3, p. 954–80, mar. 2013.

BRUGGMANN, P. et al. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. **Journal of viral hepatitis**, v. 21 Suppl 1, p. 5–33, maio 2014.

BURDETTE, D.; OLIVAREZ, M.; WARIS, G. Activation of transcription factor Nrf2 by hepatitis C virus induces the cell-survival pathway. **The Journal of general virology**, v. 91, p. 681–690, 2010.

CAPONE, F. et al. Characterization of metalloproteinases, oxidative status and inflammation levels in the different stages of fibrosis in HCV patients. **Clinical biochemistry**, v. 45, n. 7-8, p. 525–9, maio 2012.

CHEN, S. et al. Modulatory Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Human B Cell Differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 3, p. 1634–1647, 19 jul. 2007.

CHOO, Q. L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 244, p. 359–362, 1989.

COOKE, N. E.; HADDAD, J. G. **Vitamin D binding protein (Gc-globulin)** **Endocrine Reviews**, 1989.

DETNS, R. C. et al. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.

DUSSO, A. S.; BROWN, A. J.; SLATOPOLSKY, E. Vitamin D. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 289, n. 1, p. F8–28, jul. 2005.

EDFELDT, K. et al. T-cell cytokines differentially control human monocyte antimicrobial responses by regulating vitamin D metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 22593–22598, 2010.

FACTOR, V. M. et al. Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, p. 2196–2201, 2000.

FARINATI, F. et al. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *n. 3*, p. 449–456, 1995.

GABR, S. A; ALGHADIR, A. H. Prediction of fibrosis in hepatitis C patients: assessment using hydroxyproline and oxidative stress biomarkers. **Virusdisease**, v. 25, n. 1, p. 91–100, jan. 2014.

GEROVA, D. I. et al. Prevalence of vitamin D deficiency and insufficiency in Bulgarian patients with chronic Hepatitis C viral infection. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 74, n. 8, p. 665–672, nov. 2014.

GKENTZI, D. et al. Fibroblast growth factor 23 and Klotho serum levels in healthy children. **Bone**, v. 66, p. 8–14, set. 2014.

GOMBART, A. F. et al. Regulation of the CAMP gene by 1,25(OH)₂D₃ in various tissues. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 103, p. 552–557, 2007.

GOMBART, A. F.; BORREGAARD, N.; KOEFFLER, H. P. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, p. 1067–1077, 2005.

GONG, G. et al. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 17, p. 9599–604, 14 ago. 2001.

GRAMMATIKOS, G. et al. Vitamin D levels vary during antiviral treatment but are unable to predict treatment outcome in HCV genotype 1 infected patients. **PLoS one**, v. 9, n. 2, p. e87974, jan. 2014.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition reviews**, v. 52, p. 253–265, 1994.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, p. 257–265, 2012.

HARA, Y. et al. Hepatitis C virus core protein inhibits deoxycholic acid-mediated apoptosis despite generating mitochondrial reactive oxygen species. **Journal of gastroenterology**, v. 41, n. 3, p. 257–68, mar. 2006.

HARRIS, H. J. et al. Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 21092–21102, 2010.

HELLE, F.; DUBUISSON, J. Hepatitis C virus entry into host cells. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 65, n. 1, p. 100–12, jan. 2008.

HENRY, H. L.; NORMAN, A. W. Vitamin D: metabolism and biological actions. **Annual review of nutrition**, v. 4, p. 493–520, 1984.

HEWISON, M. et al. Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human health and disease. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 103, p. 316–321, 2007.

HEWISON, M. An update on vitamin D and human immunity. **Clinical endocrinology**, v. 76, n. 3, p. 315–25, mar. 2012.

HOLICK, M. F. **Vitamin D: Importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis** American Journal of Clinical Nutrition. **Anais...**2004

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. **The New England journal of medicine**, v. 357, p. 266–281, 2007.

HOLMSTRÖM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, p. 411–21, 2014.

HONDA, M. et al. Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. **Virology**, v. 222, p. 31–42, 1996.

HORNER, S. M.; GALE, M. Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. **Nature medicine**, v. 19, n. 7, p. 879–88, jul. 2013.

HORNUNG, V. et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. **Science (New York, N.Y.)**, v. 314, p. 994–997, 2006.

IVANOV, A. V et al. Hepatitis C virus proteins activate NRF2/ARE pathway by distinct ROS-dependent and independent mechanisms in HUH7 cells. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24957, jan. 2011.

JACKA, B. et al. Sequencing of the Hepatitis C Virus: A Systematic Review. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e67073, jan. 2013.

JEFFERY, L. E. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 9, p. 5458–67, 1 nov. 2009.

KIM, C. W.; CHANG, K.-M. Hepatitis C virus: virology and life cycle. **Clinical and molecular hepatology**, v. 19, n. 1, p. 17–25, mar. 2013.

KITSON, M. T. et al. Vitamin D status does not predict sustained virologic response or fibrosis stage in chronic hepatitis C genotype 1 infection. **Journal of Hepatology**, v. 58, p. 467–472, 2013.

- KOIKE, K.; MIYOSHI, H. Oxidative stress and hepatitis C viral infection. **Hepatology Research**, v. 34, p. 65–73, 2006.
- KOTTA-LOIZOU, I. et al. Hepatitis C virus core+1/ARF protein decreases hepcidin transcription through an AP1 binding site. **The Journal of general virology**, v. 94, n. Pt 7, p. 1528–34, jul. 2013.
- LADERO, J. M. et al. Vitamin D deficiency and vitamin D therapy in chronic hepatitis C. v. 12, n. 2, p. 199–204, 2013.
- LANGE, C. M. 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. **Journal of hepatology**, v. 54, n. 5, p. 887–93, maio 2011.
- LANGE, C. M. 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**, v. 7, p. e40159, 2012.
- LARRUBIA, J.-R. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 47, p. 7149, 2008.
- LAUER, G.; WALKER, B. Hepatitis C virus infection. **New England Journal of Medicine**, v. 345, p. 41–52, 2001.
- LIN, C.-C. et al. Vitamins B status and antioxidative defense in patients with chronic hepatitis B or hepatitis C virus infection. **European journal of nutrition**, v. 50, n. 7, p. 499–506, out. 2011.
- LIU, H. M. et al. The mitochondrial targeting chaperone 14-3-3 ϵ regulates a RIG-I translocon that mediates membrane association and innate antiviral immunity. **Cell Host and Microbe**, v. 11, p. 528–537, 2012.
- LIU, P. T. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. 5768, p. 1770–3, 24 mar. 2006.
- LOO, Y. M.; GALE, M. **Immune Signaling by RIG-I-like ReceptorsImmunity**, 2011.
- MACHIDA, K. et al. Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation. **Journal of virology**, v. 80, n. 14, p. 7199–207, jul. 2006.
- MAHON, B. D. et al. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 89, n. 5, p. 922–32, 1 ago. 2003.

MANDORFER, M. et al. Low vitamin D levels are associated with impaired virologic response to PEGIFN+RBV therapy in HIV-hepatitis C virus coinfecting patients. **AIDS (London, England)**, v. 27, n. 2, p. 227–32, 14 jan. 2013.

MATSUOKA, L. Y. et al. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 64, p. 1165–1168, 1987.

MCGUINNESS, P. H. et al. Increases in intrahepatic CD68 positive cells , MAC387 positive cells , and proinflammatory cytokines (particularly interleukin 18) in chronic hepatitis C infection. p. 260–269, 2000.

MCKENNA, N. J.; LANZ, R. B.; O'MALLEY, B. W. **Nuclear receptor coregulators: Cellular and molecular biology** **Endocrine Reviews**, 1999.

MILLER, G. L. Protein determination for large numbers of samples. **Anal Chem**, v. 31, p. 964, 1959.

MIURA, K. et al. Hepatitis C virus-induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 48, n. 5, p. 1420–9, nov. 2008.

MONKAWA, T. et al. Identification of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene expression in macrophages. **Kidney international**, v. 58, p. 559–568, 2000.

NAGAYAMA, K. et al. Characteristics of hepatitis C viral genome associated with disease progression. **Hepatology**, v. 31, p. 745–750, 2000.

NAKHJAVANI, M. et al. Oxidized low-density lipoprotein is associated with viral load and disease activity in patients with chronic hepatitis C. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 35, n. 2, p. 111–116, fev. 2011.

NEGASH, A. A et al. IL-1 β production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 4, p. e1003330, jan. 2013.

NEMERE, I.; YOSHIMOTO, Y.; NORMAN, A. W. Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: Enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Endocrinology**, v. 115, p. 1476–1483, 1984.

NEUMANN, A. U. et al. **Differences in viral dynamics between genotypes 1 and 2 of hepatitis C virus.** **The Journal of infectious diseases**. [s.l.: s.n.].

PAL, S. et al. Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 25, p. 627–634, 2010.

PARADIS, V. et al. In situ detection of lipid peroxidation in chronic hepatitis C: correlation with pathological features. **Journal of clinical pathology**, v. 50, p. 401–406, 1997.

PARVAIZ, F. et al. Hepatitis C virus infection: molecular pathways to insulin resistance. **Virology journal**, v. 8, n. 1, p. 474, jan. 2011.

PEDERSEN, A W. et al. Phenotypic and functional markers for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3)-modified regulatory dendritic cells. **Clinical and experimental immunology**, v. 157, n. 1, p. 48–59, jul. 2009.

PENNA, G.; ADORINI, L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Inhibits Differentiation, Maturation, Activation, and Survival of Dendritic Cells Leading to Impaired Alloreactive T Cell Activation. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 5, p. 2405–2411, 1 mar. 2000.

PETTA, S. 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 (Baltimore, Md.)**, v. 51, n. 4, p. 1158–67, abr. 2010.

PRIETL, B. et al. Vitamin D Supplementation and Regulatory T Cells in Apparently Healthy Subjects : Vitamin D Treatment for Autoimmune Diseases ? v. 12, n. march, p. 136–139, 2010.

PROVVEDINI, D. M. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. **Science**, v. 221, p. 1181–1183, 1983.

QADRI, I. et al. Induced oxidative stress and activated expression of manganese superoxide dismutase during hepatitis C virus replication: role of JNK, p38 MAPK and AP-1. **The Biochemical journal**, v. 378, p. 919–928, 2004.

RACHEZ, C.; FREEDMAN, L. P. **Mechanisms of gene regulation by vitamin D3 receptor: A network of coactivator interactions**Gene, 2000.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 357–363, 1994.

SAITO, T. et al. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. **Nature**, v. 454, p. 523–527, 2008.

SALAUN, B. et al. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, p. 4894–4901, 2006.

SALAUN, B. et al. TLR3 Can Directly Trigger Apoptosis in Human Cancer Cells 1. 2014.

SEEFF, L. B. The history of the “natural history” of hepatitis C (1968-2009). **Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver**, v. 29 Suppl 1, p. 89–99, jan. 2009.

SEKI, E.; BRENNER, D. A. **Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: Update** *Hepatology*, 2008.

SHIMODA, R. et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. **Cancer Research**, v. 54, p. 3171–3172, 1994.

SIGMUNSDOTTIR, H. et al. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to “program” T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. **Nature immunology**, v. 8, n. 3, p. 285–93, mar. 2007.

SLY, L. M. et al. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3-induced Monocyte Antimycobacterial Activity is Regulated by Phosphatidylinositol 3-Kinase and Mediated by the NADPH-dependent Phagocyte Oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 35482–35493, 2001.

SWIETEK, K.; JUSZCZYK, J. Reduced glutathione concentration in erythrocytes of patients with acute and chronic viral hepatitis. **Journal of viral hepatitis**, v. 4, p. 139–141, 1997.

TAHARA, E. B.; NAVARETE, F. D. T.; KOWALTOWSKI, A. J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, p. 1283–1297, 2009.

TAKAHASHI, K. et al. Human neutrophils express messenger RNA of vitamin D receptor and respond to $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 24, p. 335–347, 2002.

TAMAI, T. et al. Serum manganese superoxide dismutase and thioredoxin are potential prognostic markers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 17, n. 44, p. 4890–8, 28 nov. 2011.

TERRIER, B. et al. Low 25-hydroxyvitamin D serum levels correlate with the presence of extra-hepatic manifestations in chronic hepatitis C virus infection. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 51, n. 11, p. 2083–90, nov. 2012.

TONG, M. J. et al. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. **The New England journal of medicine**, v. 332, p. 1463–1466, 1995.

WAI, C.-T. et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 38, n. 2, p. 518–26, ago. 2003.

WANG, T.-T. et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, p. 2909–2912, 2004.

WEINTRAUB, S. J. et al. Vitamin D and the racial difference in the genotype 1 chronic hepatitis C. 2012.

WEN, F. et al. Increased Prooxidant Production and Enhanced Susceptibility to Glutathione Depletion in HepG2 Cells Co-expressing HCV Core Protein and CYP2E1. **Journal of Medical Virology**, v. 72, p. 230–240, 2004.

WISEMAN, H. Vitamin D is a membrane antioxidant Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol , ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. v. 326, n. July, p. 285–288, 1993.

WU, S. et al. Expression of the renal 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase gene: regulation by dietary phosphate. **The American journal of physiology**, v. 271, p. F203–F208, 1996.

WUNSCHMANN, S. et al. In vitro interaction between hepatitis C virus (HCV) envelope glycoprotein E2 and serum lipoproteins (LPs) results in enhanced cellular binding of both HCV E2 and LPs. **The Journal of infectious diseases**, v. 194, p. 1058–1067, 2006.

XU, H. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 38, p. 535–540, 1993.



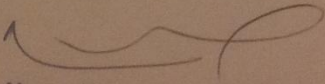
YADAV, D. et al. Serum and liver micronutrient antioxidants and serum oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. **The American journal of gastroenterology**, v. 97, n. 10, p. 2634–9, out. 2002.

YIM, S. et al. Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 6, p. 403–410, 2007.

ZHANG, J. et al. Identification of two distinct cell binding sequences in the vitamin D binding protein. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1803, p. 623–629, 2010.

ZHOU, Y.; ZHOU, X.; WANG, X. Q. 1,25-Dihydroxyvitamin D-3 prevented allergic asthma in a rat model by suppressing the expression of inducible nitric oxide synthase. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 29, p. 258–267, 2008.

ANEXO 1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

 UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA		 PARANÁ GOVERNO DO ESTADO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS Universidade Estadual de Londrina Registro CONEP 5231		
Parecer CEP/UEL:	035/2012	
CAAE:	01116612.0.0000.5231	
Processo:	4257/2012	
Pesquisador(a):	Fernanda Esteves Nascimento Barros	
Unidade/Órgão:	CCS – Programa de Mestrado em Ciências da Saúde	
Prezado(a) Senhor(a): O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto: "AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO, DOS FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR E DA FREQUÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA (SM) EM INDIVÍDUOS COM HEPATITE C CRÔNICA"		
Situação do Projeto: Aprovado		
Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá ser encaminhado ao CEP/UEL relatório final da pesquisa, conforme prevê a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares.		
Londrina, 12 de junho de 2012.		
		
Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Universidade Estadual de Londrina		

ANEXO 2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido****Título da pesquisa:**

“Avaliação da hipovitaminose D no estresse oxidativo e nos marcadores clínicos e laboratoriais da infecção crônica pelo vírus da hepatite C.”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa “AVALIAÇÃO DA HIPOVITAMINOSE D NO ESTRESSE OXIDATIVO E NOS MARCADORES CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE C”, realizada na **“Universidade Estadual de Londrina”**. O objetivo da pesquisa é analisar a associação entre os níveis de vitamina D com os marcadores do estresse oxidativo e com as alterações metabólicas em pacientes infectados pelo HCV, atendidos em Londrina e região. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: coleta de dados pessoais (antecedentes pessoais, familiares, dados antropométricos) e realização de coleta de sangue em uma única ocasião. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Após a realização dos testes com o sangue coletado, o mesmo será descartado em local apropriado para lixo hospitalar.

Os benefícios esperados são o melhor conhecimento sobre a patologia da doença e sua relação com marcadores genéticos, estresse oxidativo e lesão hepática.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar (Jorge Paulo Sales de Almeida, Av. Robert Koch, n.60, email jrg_sales@hotmail.com), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 33712490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ____ de _____ de 2013.

Pesquisador Responsável

RG:41048857-7

Jorge Paulo Sales de Almeida

(nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o campo para assinatura do menor e do responsável.

ANEXO 3 NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO NA REVISTA NUTRITION RESEARCH

Acesso 15/02/2015 <http://www.nrjournal.com/content/authorinfo>

Research articles and Reviews should generally not exceed 6000 words and Communications should not exceed 2,500.

Each manuscript submitted must provide a title page, list of abbreviations, abstract page, introduction, methods and materials, results, discussion, list of references, and appropriate presentation of data in tables and figures. In some cases, the results and discussion sections can be combined (e.g., communications).

Text must be in 12-point font (Times New Roman or Arial), double-spaced, with 1-inch margins. Consecutive line numbers must be included in the left margin, starting with the title page and ending with the reference section. Page numbers must be included in the bottom right-hand corner of each page. Text must be aligned to the left only and include 2 hard returns at the end of each paragraph, heading, and subheading.

Text should be clear and concise. Tables, figures and references must be cited in sequence in the text. Past tense should be used in reference to the work on which the paper is based, while present tense is normally limited to existing knowledge and prevailing concepts. Previous knowledge and new contributions should be clearly differentiated.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Embedded math

If you are submitting an article prepared with Microsoft Word containing embedded math equations then please read this related support information (http://support.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/302/). Displayed formulae should be numbered consecutively throughout the manuscript as (1), (2), etc. against the right-hand margin of the page. In cases where the derivation of formulae has been abbreviated, it is of great help to the referees if the full derivation can be presented on a separate sheet not to be published.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Abbreviations and Symbols

Use only standard abbreviations (Scientific Style and Format, The CBE Style Manual for Authors, Editors, and Publishers, 6th ed. Council of Biology, Chicago IL 1994). Abbreviations should not be used in the title or major headings. The full term for which an abbreviation stands for should precede its first use in the text.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract (limited to 250 words) should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Experimental Diets

All studies that include experimental diets must provide a table that lists the ingredients and enough detail for the nutrient content of those diets. Reference to established diets (such as AIN 93G) is appropriate when the major ingredients are listed and the premix levels are provided (actual details of each vitamin and mineral source listed is not necessary in this case). Diets that are developed with different lipid sources should provide a fatty acid compositional analysis of the lipids. In addition, studies that test a botanical or phytochemical ingredient should provide enough chemical compositional analysis as well as the amount of the active compounds

Statistical Methods

Tests of statistical analysis must be fully described. Statements about statistical significance of results must be accompanied by indications of the level of significance. This information must be included where numerical and graphic presentation of data is made in the manuscript in footnotes to tables and in the captions of figures rather than in the text only. Also in the statistical methods section of the manuscript, indicate how the data are presented. For example, means - standard deviation must be shown. Always take special care to present only the significant figures for a measurement and appropriate sample size relevant to a power analysis

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

- Must be numbered consecutively with Arabic numerals.
- Start each table on its own page.
- Use minimal horizontal lines and no vertical lines.
- Must have a description so that reader can understand the table without referring to the text.
- Must have an explanation of the values and statistics used for analysis of the data and properly referenced.

Tables must be in an editable (word) file.

* All studies that include experimental diets must provide a table that lists the ingredients and enough detail for the nutrient content of those diets. Reference to established diets (such as AIN 93G) is appropriate when the major ingredients are listed and the premix levels are provided (actual details of each vitamin and mineral source listed is not necessary in this case). Diets that are developed with different lipid sources should provide a fatty acid compositional analysis of the lipids. In addition, studies that test a botanical or phytochemical ingredient should provide enough chemical compositional analysis as well as the amount of the active compounds.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together

with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission Checklist

- A downloadable checklist is available on the EES Website.
- The checklist must be completed and signed by the Corresponding Author.

Document File

- Title page - page 1

Title - single, declarative statement, stating the major finding of the work.

First name, Middle initial, and Last name of each author (no titles such as MD or PhD).

The affiliations of each author noted with superscripts.

Complete contact information for corresponding author.

Running heads, word counts, and any other information other than that stated above should not be included.

- Abbreviations page - page 2

Must include 1 abbreviation with meaning per line.

Abbreviations should be listed first followed by a semicolon and then the meaning.

Abbreviations must be spelled out when used in the text for the first time.

- Abstract page - page 3

A single, double-spaced paragraph (250 word limit) that includes the hypothesis for the study, experimental design, use of the model for the study, major results, and conclusion. Do not include subheadings in this section.

It must follow the same format as the rest of the text (alignment, spacing, line numbering, etc.).

- List of at least 5 keywords/phrases taken from the medical subject headings of the Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>) below the abstract. The model used in the study must be included in the keywords.

- Manuscript text

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'

- Main headings and subheadings must be numbered with Arabic numerals.

- Text must start on a new page and include the following main headings:

Introduction - must state the hypothesis for the research and the supporting objectives to test the hypothesis. Must also state how this study advances human nutrition.

Methods and materials - must explain the experimental design, control and treated groups; details of ingredient composition of diets should be presented in a table; all procedures and techniques must be explained and referenced; method of euthanasia for experimental animals must be stated; statistical analyses section must be complete with information on data presentation; must contain statistical tests and appropriate references; and must include an institutional statement of protocol approval for animal or human subjects (human consent is required).

Results - must thoroughly describe the data presented in tables and figures.

Discussion- should contain a specific description of the literature findings relevant to the results of the current investigation but not go beyond the data presented in the results. The limitations of the study should be included in this section.

Acknowledgment (note spelling).

- Technical or editorial assistance must be acknowledged.

- Financial (grants or gifts) and other support as deemed as appropriate for the study must be indicated.

Do not include author contributions or individual titles (i.e., Dr., PhD, etc...) in this section. If there is a conflict of interest, that must be stated in this section.


- References

Number consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.

In-text citations and reference list numbers must be enclosed within brackets, e.g., [1,2].

The author should make certain that there is a strict one-to- one correspondence between references cited in the text and those in the reference list.

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at  <http://support.elsevier.com>.