



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCAS SILVA LIBERATTI

**ENVOLVIMENTO DO POLIMORFISMO *PvuII* NO INTRON 15
DO GENE *RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA
DENSIDADE* NO ESTRESSE OXIDATIVO, PERFIL LIPÍDICO
E NA LESÃO HEPÁTICA EM PACIENTES COM HEPATITE C
CRÔNICA**

Londrina
2015

LUCAS SILVA LIBERATTI

**ENVOLVIMENTO DO POLIMORFISMO *PvuII* NO INTRON 15
DO GENE *RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA
DENSIDADE* NO ESTRESSE OXIDATIVO, PERFIL LIPÍDICO
E NA LESÃO HEPÁTICA EM PACIENTES COM HEPATITE C
CRÔNICA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L695e	<p>Liberatti, Lucas Silva. Envolvimento do polimorfismo <i>PvuII</i> no intron 15 do gene receptor de lipoproteína de baixa densidade no estresse oxidativo, perfil lipídico e na lesão hepática em pacientes com hepatite C crônica / Lucas Silva Liberatti. – Londrina, 2015. 73 f. : il.</p> <p>Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche. 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.</p> <p>1. Hepatite C – Teses. 2. Polimorfismo (Genética) – Teses. 3. Estresse oxidativo – Teses. I. Reiche, Edna Maria Vissoci. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 616.36-002</p>
-------	--

LUCAS SILVA LIBERATTI

**ENVOLVIMENTO DO POLIMORFISMO *PvuII* NO INTRON 15 DO
GENE *RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE* NO
ESTRESSE OXIDATIVO, PERFIL LIPÍDICO E NA LESÃO HEPÁTICA
EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa Dra. Edna Maria Vissoci
Reiche
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Prof. Dr. Isaías Dichi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 11 de fevereiro de 2015

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente aos meus pais, que me apoiaram e não mediram esforços para que eu continuasse a estudar.

À minha orientadora Professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche pela disponibilidade e constante dedicação em me orientar, inclusive em horários fora do expediente devido ao meu trabalho.

Agradeço aos professores Dra. Andréa Name Colado Simão, Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida e pela companheira de projeto Fernanda Esteves Nascimento, por estarem sempre dispostos a ajudar nas atividades de pesquisa e pela ativa colaboração neste projeto.

A todos os demais participantes da nossa equipe de trabalho: Ana Paula Kallaur, Professora Helena Kaminami Morimoto e, principalmente, à Francielli Delongui, pela ajuda diária no laboratório, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu amigo Jorge Paulo Sales de Almeida, não só por sua ajuda desde a coleta de material até realização dos exames para este trabalho, mas também pela amizade e companheirismo durante toda a graduação e pós-graduação. À Jhayanne pelo apoio e sua participação na correção ortográfica da minha dissertação.

Agradeço à Fundação CAPES, pela grande contribuição a concessão da bolsa de auxílio à pós-graduação, viabilizando a realização deste estudo.

Liberatti, Lucas Silva. **Envolvimento do polimorfismo *PvuII* no intron 15 do gene receptor de lipoproteína de baixa densidade no estresse oxidativo, perfil lipídico e na lesão hepática em pacientes com hepatite C crônica**. 2015. 73 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Hepatite C (HC) é uma doença infecciosa causada pelo vírus da hepatite C (HCV), um RNA vírus. As proteínas do HCV e a replicação viral provocam alterações nos níveis séricos de lipídios e ferro, aumento do estresse oxidativo e lesão hepática, fatores que levam a um pior prognóstico da doença. O HCV utiliza vários receptores para infectar as células, entre eles o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR). Variações na expressão deste receptor podem alterar a entrada do vírus nas células e, assim, modificar os efeitos que ele causa no organismo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o envolvimento do polimorfismo *PvuII* no intron 15 do gene *LDLR* nos níveis de marcadores do estresse oxidativo, antígeno (Ag) core do HCV e na lesão hepática em pacientes com HC crônica (HCC). Foram avaliados 46 pacientes com HCC e 87 doadores de sangue saudáveis, controlados por idade, sexo, etnia, tabagismo, índice de massa corpórea (IMC) e consumo de álcool. Foi realizado um estudo caso-controle para comparar dados entre pacientes e controles e um estudo transversal para a determinação da associação entre os genótipos do polimorfismo *PvuII* no gene *LDLR* com os marcadores de lesão hepática, de estresse oxidativo e Ag de core do HCV em indivíduos cronicamente infectados. Nessa parte do estudo, os pacientes foram divididos em portadores e não portadores do alelo P2. O polimorfismo genético *PvuII* do *LDLR* foi avaliado por reação em cadeia da polimerase seguida do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP). O estresse oxidativo foi avaliado pela formação de hidroperóxidos lipídicos iniciada por t-butil (CL-LOOH), determinação de produtos avançados da oxidação protéica (AOPP), *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter* (TRAP) e pelo índice de estresse oxidativo (OSI). Os marcadores bioquímicos avaliados foram os níveis séricos de ácido úrico, ferro, ferritina, colesterol total (CT), colesterol lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), colesterol lipoproteína de alta densidade (HDL-C), triglicerídeos (TG) e enzimas hepáticas como aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama glutamiltransferase (γ GT). O nível de fibrose hepática foi estimado utilizando o APRI (*AST to platelet index ratio*). Foi realizada também a quantificação do Ag core do HCV por imunoensaio de quimioluminescência. Pacientes com HCC apresentaram níveis séricos mais elevados de AST, ALT, γ GT, ferritina ($p < 0,0001$), ferro ($p = 0,0019$), hidroperóxidos ($p = 0,0067$) e valores maiores do OSI ($p = 0,0001$), assim como níveis diminuídos de CT, LDL-C (todos $p < 0,0001$), TG ($p = 0,0395$), HDL-C ($p = 0,0388$) e da relação TRAP/ácido úrico ($p = 0,0302$) comparados com o grupo controle. Os grupos não diferiram quanto a frequência dos genótipos P1P1, P1P2 e P2P2, sendo de 58,7%, 34,8% e 6,5% respectivamente, nos pacientes e de 54,0%, 43,7% e 2,3%, respectivamente, nos controles (*odds ratio*: 1,226; intervalo de confiança de 95%: 0,7002-2,146, $p = 0,583$). Entre os indivíduos com HCC, os portadores dos genótipos P1P2 + P2P2 apresentaram valores mais elevados de AST ($p = 0,0438$), ALT ($p = 0,0271$), LDL-C ($p = 0,0281$) hidroperóxido ($p = 0,0398$) e APRI ($p = 0,0265$) e menores de Ag core HCV ($p = 0,0235$) que os pacientes com o genótipo

P1P1. Os valores de APRI apresentaram correlação negativa com CT ($r:-0,440$, $p=0,0354$) e TG ($r:-0,570$, $p=0,0045$) e correlação positiva com os níveis de Ag core HCV ($r: 0,456$, $p=0,0435$). Os resultados confirmam que a HCC está associada com hipotrigliceridemia, hipocolesterolemia e aumento do estresse oxidativo; os resultados também sugerem que pacientes portadores do alelo P2 do polimorfismo *PvuII* do *LDLR* possuem maior expressão do LDLR, levando ao aumento da entrada do HCV no interior dos hepatócitos, o que explicaria sua associação com maior nível de estresse oxidativo e maior lesão hepática. Esta variante genética poderia ser um marcador candidato para a identificação de indivíduos com maior risco de desenvolverem maiores níveis de estresse oxidativo e lesão hepática e que poderiam se beneficiar com estratégias terapêuticas específicas para estes efeitos deletérios associados ao HCV.

Palavras-chave: Hepatite C. HCV. Polimorfismo genético. Receptor de lipoproteína de baixa densidade. Estresse oxidativo. APRI. Lesão hepática.

Liberatti, Lucas Silva. **Involvement of *PvuII* intron 15 genetic polymorphism of low-density lipoprotein receptor (LDLR) in the lipid profile, oxidative stress, and in liver injury in patients with chronic hepatitis C.** 2015. 73 p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Hepatitis C (HC) is an infectious disease caused by the hepatitis C virus (HCV), a RNA virus. HCV proteins and viral replication cause changes in the levels of lipids and iron, as well as increase oxidative stress and liver injury, factors that lead to a worse prognosis. The HCV uses various receptors to infect host cells, mainly the low-density lipoprotein receptor (LDLR). The variations in the expression of this receptor can alter virus entry into cells and thus modify its effects in the body. The objective of this study was to evaluate the involvement of the *PvuII* polymorphism of *LDLR* gene in the lipid levels, oxidative stress markers, HCV core antigen (Ag), and in liver damage in patients with chronic HC (CHC). We evaluated 46 patients with HCC and 87 healthy blood donors, controlled for age, sex, ethnicity, smoking, body mass index (BMI), and alcohol consumption. A case-control was performed to compare data between patients and controls and a cross-sectional study to determine the association between the genotypes of the *PvuII* *LDLR* polymorphism with markers of liver injury, oxidative stress and HCV core Ag in individuals chronically infected. For the last aim, patients were divided into carriers and non-carriers of the P2 allele. The *PvuII* *LDLR* polymorphism was evaluated using polymerase chain reaction, followed by the restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Oxidative stress was evaluated using the formation of lipid hydroperoxide initiated by t-butyl (CL-LOOH), determination of advanced oxidation protein products (AOPP), Total Radical Trapping Antioxidant Parameter (TRAP), and oxidative stress index (OSI). The biochemical markers evaluated were serum levels of iron, ferritin, uric acid, total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG), and liver enzymes, such as aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and gamma glutamyltransferase (γ GT). The degree of hepatic fibrosis was estimated using the AST to platelet index ratio (APRI). The quantification of the HCV core Ag was performed using chemiluminescence assay. CHC patients showed increased serum levels of AST, ALT, γ GT, ferritin ($p < 0.0001$), hydroperoxides ($p = 0.0067$), iron ($p = 0.0019$), and OSI values ($p < 0.0001$), and decreased TC, LDL-C ($p < 0.0001$), HDL-C ($p = 0.0388$), TG ($p = 0.0395$), and TRAP/uric acid ($p = 0.0302$) compared with the controls. The groups did not differ in terms of the frequency of the P1P1, P1P2 and P2P23 genotypes that was 58.7%, 34.8%, and 6.5%, respectively, among the patients, and 54.0%, 43.7%, and 2.3%, respectively, among the controls (Odds ratio: 1.226, 95% confidence interval 0.7002-2.146, $p = 0.583$). Patients carrying the P1P2 + P2P2 genotypes exhibited higher levels of AST ($p = 0.0438$), ALT ($p = 0.0271$), LDL-C (0.0281), hydroperoxide ($p = 0.0398$), and APRI scores ($p = 0.0265$), and decreased HCV core Ag ($p = 0.0235$) that those with the P1P1 genotype. APRI showed negative correlation with TC ($r = -0.440$, $p = 0.0354$) and TG ($r = -0.570$, $p = 0.0045$) and positive correlation with HCV core Ag ($r = 0.456$, $p = 0.0435$). The results underscore that CHC is associated with hypocholesterolemia, hypotriglyceridemia, and increased oxidative stress; moreover, the results suggest that patients carrying the P2 allele may have

higher expression of the LDLR than those carrying P1 allele, which leads to an increase of the virus entry into hepatocytes and an increase in oxidative stress and liver damage. Therefore, this genetic variant may be a candidate marker to identify the individuals with high risk for developing oxidative stress and liver injury that could be benefit with specific therapy approaches for these deleterious HCV-associated effects.

Key words: C hepatitis. Genetic polymorphism. Low-density cholesterol receptor. Oxidative stress. APRI. Liver injury.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOPP	<i>Advanced oxidation protein products</i> – produtos avançados de oxidação protéica
APRI	<i>AST to plateletratio index</i> – relação entre AST e plaquetas
CL-LOOH	<i>Tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence</i> – quimioluminescência de peróxidos iniciada por tert-butil
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - ácido desoxirribonucleico
EDTA	<i>Ethylenedinitrilotetraacetic acid</i> - ácido etilenodiamino tetracético
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutationa
HCV	<i>Hepatitis C virus</i> – vírus da hepatite C
HCC	Hepatite C crônica
HDL	<i>High-density lipoprotein</i> – lipoproteína de alta densidade
HF	Hipercolesterolemia familiar
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HMG CoAred	3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase
HO-1	Heme-oxigenase-1
IDL	<i>Intermediate density lipoprotein</i> - lipoproteína de densidade intermediária
IFN- α	Interferon alfa
IL-28B	Interleucina-28B
IPs	Inibidores de protease
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> - lipoproteína de baixa densidade
LPV	Lipopartículas virais
LDLR	<i>Low density lipoprotein receptor</i> - receptor de lipoproteína de baixa densidade
MTP	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i> – proteína microssomal de transferência de triglicerídeos
RAPP- γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
RE	Retículo endoplasmático

RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – ácido ribonucleico
RBV	Ribavirina
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> - características operacionais do receptor
RVS	Resposta virológica sustentada
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> - polimorfismo de um único nucleotídeo
SOD	Superóxido dismutase
SR-BI	<i>Scavenger receptor class B type 1</i> -classe B Scavenger Receptor tipo 1
SREBP1	Proteína de ligação ao elemento de regulação de esterol 1
SOCS	Citocinas supressoras de sinais
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Triglicerídeos
TRAP	<i>Total-Radical Trapping Antioxidant Parameter</i>
Trx	Tiorredoxina
URL	Unidades relativas de luz
UV	Ultravioleta
VLDL	<i>Very-low density lipoprotein</i> - lipoproteína de densidade muito baixa
VNTR	<i>Variable number tandem repeat</i> – número variável de repetições ao acaso
OSI	<i>Oxidative stress index</i> - índice de estresse oxidativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	HEPATITE C	12
1.2	O VÍRUS	13
1.3	A INFECÇÃO PELO HCV E O RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDLR).....	14
1.4	POLIMORFISMO DO GENE LDLR E HEPATITE C.....	16
1.5	HEPATITE C, ESTRESSE OXIDATIVO E ALTERAÇÕES LIPÍDICAS	19
1.6	EVOLUÇÃO DO TRATAMENTO PARA A HEPATITE C	22
2	JUSTIFICATIVA	23
3	OBJETIVOS	24
3.1	OBJETIVO GERAL.....	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	25
4.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO	25
4.3	INDIVÍDUOS	25
4.3.1	Critérios de Inclusão e Exclusão para os Pacientes.....	26
4.3.2	Critérios de Inclusão e Exclusão para os Controles.....	26
4.4	AVALIAÇÕES DO ÍNDICE DE MASSA CORPORAL (IMC), CIRCUNFERÊNCIA ABDOMINAL E DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL	26
4.5	AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE ÁLCOOL.....	26
4.6	AVALIAÇÃO DO TABAGISMO.....	27
4.7	MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	27
4.8	POLIMORFISMO GENÉTICO PVUII DO INTRON 15 DO LDLR	27
4.8.1	Extração do DNA Genômico	27
4.8.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	28
4.8.3	Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP).....	29
4.9	MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO	30
4.9.1	Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter (TRAP).....	30

4.9.2	Determinação de Hidroperóxidos Lipídicos Iniciados por t-butil (CL- LOOH).....	31
4.9.3	Advanced Oxidation Protein Products (AOPP)	31
4.9.4	Índice de Estresse Oxidativo (Oxidative Stress Index, OSI).....	31
4.10	ÍNDICE DE AST E PLAQUETAS (AST TO PLATELET RATIO INDEX, APRI).....	32
4.11	DETERMINAÇÃO DO AG CORE DO HCV (AG CORE HCV)	32
4.12	DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL E GENÓTIPO DO HCV	32
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5	RESULTADOS	34
6	CONCLUSÕES	61
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXOS	70
	ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA	71
	ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 HEPATITE C

Desde 1989, quando foi inicialmente isolado no soro de uma pessoa com hepatite não-A não-B, o vírus da hepatite C (HCV) é reconhecido como a principal causa de doença hepática crônica no mundo (CHOO et al. 1989). Entre os indivíduos expostos ao HCV, em média 70% (variando entre 50% a 85% dos casos) evoluem para a forma crônica da doença, caracterizada pela persistência do RNA-HCV e elevação das enzimas hepáticas após seis meses de infecção (SHEPARD et al. 2005).

Atualmente, estima-se que aproximadamente 3% da população mundial esteja infectada pelo HCV, o que representa cerca de 170 milhões de indivíduos infectados cronicamente e com risco de desenvolver, após 20 a 30 anos, as complicações da doença, como cirrose (10-20%) e câncer hepático (1-5%), responsáveis anualmente por 350.000 mortes (MOHD HANAFIAH et al. 2013; BOSTAN & MAHMOOD 2010).

A transmissão do HCV ocorre por meio de exposição percutânea com sangue infectado, transfusão de sangue e/ou hemoderivados e transplantes de órgãos ou células provenientes de doadores infectados. Atualmente, destacam-se como importantes formas de transmissão do HCV o compartilhamento de equipamentos para uso de drogas injetáveis, confecção de tatuagens e exposição sexual (CDC, 1998).

Em 1992, foi desenvolvido o primeiro teste laboratorial para detecção do anticorpo contra o HCV (anti-HCV) que, ao longo dos anos seguintes, foi aprimorado em termos de sensibilidade e especificidade, proporcionando maior segurança na seleção de doadores de sangue e, conseqüentemente, nas transfusões sanguíneas (LAUER; WALKER, 2001).

As lesões histológicas típicas na hepatite C crônica (HCC) constituem necrose hepatocelular, inflamação (avaliada em graus) e fibrose (avaliada em estágios). O desenvolvimento da fibrose é progressivo e, em última instância, leva à cirrose. O colágeno que constitui essa rede fibrosa é produzido pelas células estreladas hepáticas que são ativadas pela inflamação causada pela infecção viral (MARCELLIN et al. 2002). Outra característica histológica na HCC, reconhecida

como uma causa significativa de fibrose e cirrose é a esteatose hepática, definida como o acúmulo excessivo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos (FIERBINȚEANU-BRATICEVICI et al. 2010).

Existem duas formas de esteatose presentes em indivíduos com HCC. A esteatose induzida pelo HCV, chamada de esteatose viral, cuja infiltração lipídica é provocada diretamente pelo vírus. A outra é a esteatose metabólica que, normalmente, é independente do genótipo do HCV, resulta da disfunção mitocondrial envolvida no processo de β -oxidação dos ácidos graxos e ocorre em quadros de obesidade, dislipidemia e síndrome metabólica (CICHOŹ-LACH; MICHALAK 2014).

1.2 O VÍRUS

O HCV é um vírus RNA de cadeia simples pertencente à Família Flaviviridae; 9.6 kilobases (Kb) do seu genoma codificam uma única poliproteína, que é processada, após a tradução, por proteases da célula infectada e do vírus, em proteínas estruturais e não estruturais (NS) (EGGER et al. 2002). A porção amino terminal da poliproteína codifica as seguintes proteínas estruturais do vírus: core, E1, E2 e uma pequena proteína de membrana, p7, que funciona como canal iônico. O restante da poliproteína codifica as proteínas NS, tais como NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B. Com exceção da NS2, todas as outras NS são necessárias para a replicação viral (STEINMANN; PIETSCHMANN, 2010; HARBORING et al. 2003). O processo de replicação do HCV ocorre no citoplasma do hepatócito com uma taxa entre 10^{10} a 10^{12} vírions por dia, com meia-vida viral na circulação estimada de 2 a 3 horas (LINDENBACH; RICE, 2005).

Com base na heterogeneidade da sequência genômica, o HCV é classificado em seis principais genótipos (designados de 1 a 6, que diferem entre si em torno de 31 a 33% do seu material genético), em diversos subtipos e em cerca de 100 diferentes cepas. Os genótipos 1a, 1b, 2 e 3 têm distribuição mundial e os genótipos 1a e 1b são os mais comuns, representando 60% das infecções no mundo (ZEIN, 2000). As frequentes mutações do HCV e os numerosos subtipos virais são alguns dos obstáculos para o desenvolvimento de uma vacina eficaz.

O HCV infecta, principalmente, os hepatócitos, células que desempenham um papel fundamental na homeostase do colesterol nos mamíferos. Seu ciclo de vida é dependente do metabolismo lipídico dessas células, pois elas sintetizam

colesterol por meio da via do mevalonato, que dá origem ao composto lipídico geranylgeranil. Esse composto é fundamental para a replicação do HCV devido à sua interação com a NS5A. A necessidade do HCV pelo geranylgeranil é comprovada por estudos com uso de estatinas inibidoras da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMG CoAred) que bloqueiam toda a via do mevalonato, o que resulta na inibição da replicação viral devido ao esgotamento das reservas de geranylgeranil lipídico (IKEDA et al. 2006; YE et al. 2003; KAPADIA; CHISARI, 2004; WANG et al. 2005).

1.3 A INFEÇÃO PELO HCV E O RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDLR)

Após atingir a circulação sanguínea, o HCV assume quatro formas que podem utilizar diferentes receptores para se ligar e entrar nas células. As formas possíveis são: 1) partículas não ligadas a lipídeos; 2) partículas ligadas às lipoproteínas, chamadas de lipopartículas virais (LPVs), que representam cerca de 77% do vírus circulante e possuem uma maior infectividade que as partículas não ligadas a lipídios; 3) partículas envelopadas e 4) partículas não envelopadas. Para se aderir aos hepatócitos, o vírus utiliza as proteínas do envelope, E1 e E2, que interagem com o receptor CD81 e o receptor *scavenger* classe B tipo 1 (SR-BI) da membrana celular. No entanto, esses receptores parecem agir em etapas posteriores do processo de entrada do vírus (BURLONE; BUDKOWSKA, 2009).

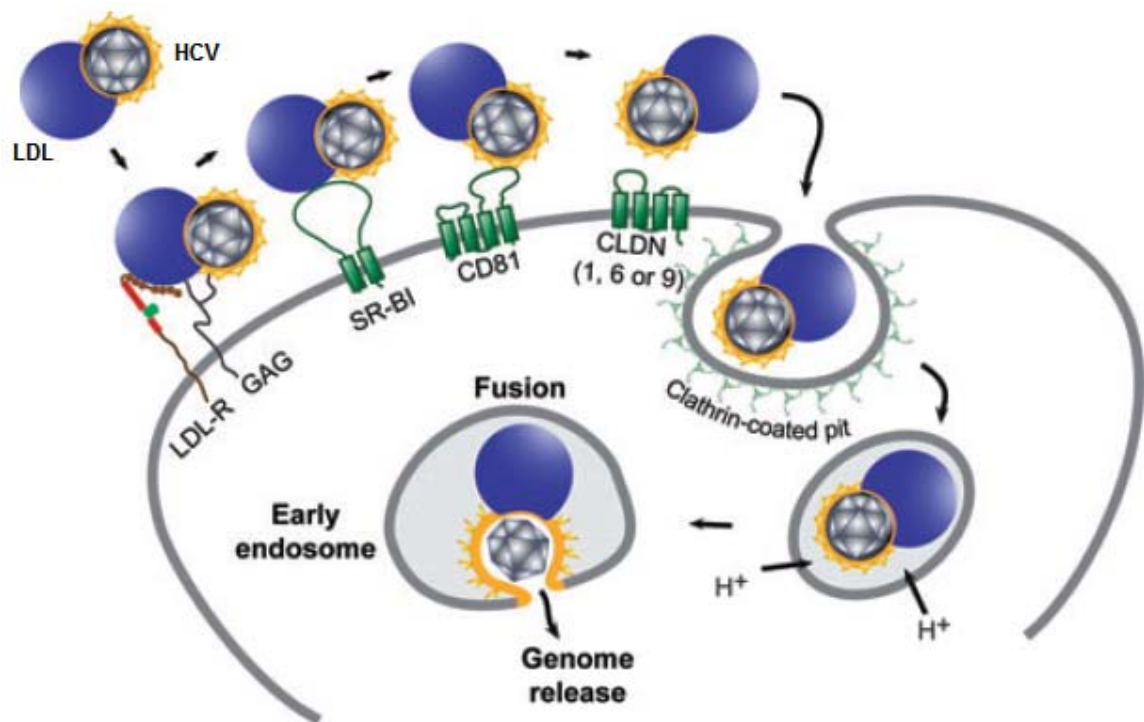
O LDLR mostra-se uma importante via de entrada do vírus aos hepatócitos, pois promove a endocitose das frações do colesterol, como lipoproteína de baixa densidade (*low-density lipoprotein*, LDL-C) e de lipoproteína de densidade intermediária (*intermediate density lipoprotein*, IDL), via clatrina e, conseqüentemente, das LPVs (ANDRÉ et al., 2002; BARTOSCH; DUBUISSON, 2010; DIEDRICH, 2006; MOLINA et al., 2007). Assim, o mecanismo de entrada do HCV via LDLR ocorre inicialmente com a proteína E2, que se liga ao LDL-C e forma a LPV (WÜNSCHMANN et al. 2000), o que possibilita a ligação com o LDLR da membrana celular dos hepatócitos. Após este reconhecimento, a LPV se liga ao SR-B1 e, em sequência, é transferida ao CD81. Esse complexo vírus-receptor provavelmente migra lateralmente para região de junção estreita, onde interage com

a claudina 1 e é finalmente endocitado através das clatrininas (Figura 1) (KIM; CHANG, 2013).

A importância do LDLR para a entrada do HCV nas células é confirmada, pois, mesmo com a grande distribuição do receptor CD81 nos diferentes tecidos, o HCV possui tropismo pelas células hepáticas, onde se encontra o LDLR. E a inibição completa, *in vitro*, da endocitose do HCV em uma variedade de células por anticorpos contra o LDLR, sugere que esta molécula possa ser a principal via para a entrada do vírus nas células do hospedeiro (AGNELLO et al., 1999). Outro estudo encontrou significativa associação entre a expressão do LDLR na superfície de células mononucleares de pacientes cronicamente infectados com HCV e não tratados com a carga viral de HCV, enquanto que as variáveis como idade, índice de massa corpórea (IMC) e fibrose não apresentaram esta associação. Estes resultados sugeriram que o LDLR pode ser um dos receptores implicados na replicação do HCV (PETIT et al., 2007).

Thomssen e colaboradores (1993) identificaram uma associação entre HCV e LDL-C no soro humano e, em seguida, demonstraram uma interação entre HCV ou complexos HCV-LDL com o receptor celular dessa lipoproteína. Seipp et al (1997) demonstraram que ocorre uma replicação persistente do HCV em linhagens de hepatócitos caso eles forem mantidos sob condições de hiperexpressão do LDLR. Estudos posteriores demonstraram que o HCV não se ligava em fibroblastos deficientes de LDLR, mas que a expressão recombinante do LDLR humano nestas células promovia a ligação do vírus (MONAZAHIAN et al., 1999).

Figura 1 – Modelo da entrada do vírus da hepatite C (HCV) no hepatócito. O mecanismo de entrada do HCV via receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) ocorre inicialmente com a proteína E2, que se liga à lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e forma a lipopartícula viral (LPV), o que possibilita a ligação com o LDLR da membrana celular dos hepatócitos. Após este reconhecimento, a LPV se liga ao receptor *scavenger* B tipo 1 (SR-B1) e, em sequência, é transferida ao CD81. Esse complexo vírus-receptor provavelmente migra lateralmente para região de junção estreita, onde interage com a claudina (CLDN) 1 e é finalmente endocitado através das clatras



Fonte: KIM; CHANG (2013).

1.4 POLIMORFISMO DO GENE *LDLR* E HEPATITE C

As diferenças genéticas herdadas contribuem para variações fenotípicas e influenciam desde as características antropométricas dos indivíduos até uma maior suscetibilidade para doenças. A principal variação da sequência genética humana é atribuída ao polimorfismo de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism*, SNP), que ocorre, em média, a cada 1.000 a 2.000 bases. As demais variações do genoma são decorrentes de inserções ou deleções de uma ou mais bases, variação de número de repetições ao acaso (*variable number tandem repeat*, VNTR) e rearranjos (LI; SADLER 1991; MILLER; KWOK 2001; WANG et al. 1998; SUNYAEV et al. 2000).

Fatores tanto do hospedeiro como idade, sexo, índice de massa corpórea (IMC) e nível de fibrose hepática, quanto virais como carga viral e genótipos, têm sido relacionados com o sucesso do tratamento e a evolução da HCC. No entanto, mesmo controlando esses fatores, a resposta ao tratamento continua variada, mostrando que diferenças genéticas entre os pacientes modulam a capacidade do organismo na resposta ao tratamento (OSINUSI et al. 2013). Atualmente, os avanços tecnológicos permitem a detecção de mais de meio milhão de variantes genéticas envolvidas com doenças, o que possibilita a tomada de decisão em relação ao tratamento para cada paciente de acordo com sua variante genética, ou seja, a utilização da farmacogenética.

O LDLR modula os níveis plasmáticos de LDL-C, regulando a absorção destas partículas pelo fígado e a entrega de colesterol às glândulas supra-renais e gonadais para a síntese de hormônios esteróides, e ao fígado, para a síntese de ácidos biliares (BROWN; GOLDSTEIN, 1986). O gene *LDLR* localiza-se no cromossomo 19, compreende 18 éxons e 17 íntrons e codifica uma proteína de 839 aminoácidos (SÜDHOF et al., 1985). Já foram descritas mais de 1288 variantes diferentes para o *LDLR* em pacientes com hipercolesterolemia familiar (HF), um distúrbio genético caracterizado pela elevação dos níveis plasmáticos de LDL-C e colesterol total (CT), xantomas e aterosclerose precoce (SASS et al., 1995). Destas variantes, 55% correspondem a substituições em regiões de éxons, 22% são pequenos rearranjos em éxons com menos de 100 pares de bases (pb), 11% são grandes rearranjos com mais de 100 pb, 10% em íntrons, 2% ocorrem em regiões promotoras e 1 variação detectada na região 3' não transcrita (3' UTR) (LEIGH et al., 2008; USIFO et al., 2012). Alguns destes polimorfismos genéticos alteram os éxons e outros alteram o nível de expressão do receptor (íntrons) (MARQUES et al. 2009).

Polimorfismos no gene *LDLR* vêm sendo estudados na tentativa de associá-los à evolução e ao tratamento de pacientes com HCC porque, além deste receptor ser responsável pela homeostase do colesterol, também é um dos que possibilita a entrada do HCV nas células (AGNELLO et al., 1999; BURLONE; BUDKOWSKA, 2009; DIEDRICH, 2006; BARTOSCH; PETIT et al., 2007; DUBUISSON, 2010; TANWANDEE et al., 2011). Além disso, os níveis de LDL-C plasmáticos (regulados pelo LDLR) são preditores independentes da resposta virológica sustentada (RVS) em pacientes tratados com interferon alfa (IFN- α) peguilado associado à ribavirina (peg-IFN α /RBV) (DEL VALLE et al., 2008; HARRISON et al., 2010).

Embora contraditórios, estudos avaliaram a associação entre polimorfismos genéticos do *LDLR* e a infecção pelo HCV. Hennig et al. (2002) e Marques et al (2009), relataram associação entre os polimorfismos localizados no éxon 10 e na região 3'UTR do gene *LDLR* com o *clearance* viral e com a resposta ao tratamento com IFN- α , respectivamente. Em relação ao SNP c.1433 do éxon 10, esses autores encontraram resultados semelhantes, mostrando que pacientes portadores desse polimorfismo têm mais chances de desenvolver o hepatocarcinoma celular.

Estudos mostraram que o SNP rs14158 no gene *LDLR* modifica a redução da carga viral dos pacientes nas primeiras semanas de tratamento com peg-IFN- α /RBV, associando o homocigoto CC com melhor prognóstico do tratamento (RIVERO-JUAREZ et al. 2012). Também mostraram que esse mesmo polimorfismo, quando utilizado em conjunto com o rs12979860 no gene *IL-28B* (gene que codifica uma interleucina modificadora da expressão dos genes estimuladores de IFN), tem um efeito sinérgico na predição da SVR nos pacientes coinfectados com HCV e o vírus da imunodeficiência humana tipo 1(HIV-1) (PINEDA et al. 2011).

Vários SNPs do *LDLR* foram avaliados com pelos métodos da reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida pelo polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP). O emprego de diferentes enzimas de restrição identificam estes SNPs, tais como o *Rsal* (extremidade 5'), *Stul* (exon 2), *Maelll* (exon 4), *TaqI* (intron 4), *SphI* (intron 6), *Stul* (exon 8), *HhaI* (exon 11), *HincII* (exon 12), *Avall* (exon 13), *MspI* (exon 15), *PvuII* (intron 15), *MspI* e *NcoI* (exon 18) e *PstI* (extremidade 3') (VILLÉGER et al., 2002). O efeito dos SNPs *Avall*, *PvuII* e *ApaLI* (extremidades 5' e 3') do *LDLR* nos níveis plasmáticos de CT e de LDL-C foi avaliado em indivíduos normolipêmicos da região da Ligúria, Itália (HUMPHRIES et al., 1991). Os autores demonstraram que o alelo P2 do polimorfismo *PvuII* foi associado com diminuição de CT e LDL-C, explicando 9,6% das variações observadas nos valores destes marcadores lipídicos e que os demais SNPs avaliados estavam em forte desequilíbrio de ligação com o SNP *PvuII* e foram associados com pequenos efeitos no LDL-C.

O polimorfismo *PvuII* localizado no íntron 15 do *LDLR* foi considerado um marcador genético ligado à variação do *LDLR* que pode alterar a estrutura e a atividade do receptor ou alterar a função regulatória da expressão gênica e, deste modo, alterar os níveis circulantes dos lipídeos (GUDNASON et al., 1998). Este polimorfismo consiste na substituição da Citosina (C) por uma Timina (T) dentro da

sequência CAGCCG em uma posição aproximadamente 900 pb da região 3' final do exon 16. Com esta substituição, cria-se o sítio de restrição da enzima *PvuII* (CAG ↓ CTG). Este polimorfismo tem sido associado com diferenças na concentração do LDL-C em indivíduos normo e hipercolesterolêmicos de diferentes países (LEITERSDORF; CHAKRAVARTI; HOBBS, 1989; HUMPHRIES et al., 1991; BERTOLINI et al., 1992; JAVIER CHAVES et al., 1996). Tanwande et al. (2011) avaliaram 11 polimorfismos no gene *LDLR*, entre os quais não incluíram o *PvuII*, e não encontraram associação entre eles e a resposta ao tratamento nos pacientes com HCC.

Salazar e colaboradores (2000a; 2000b; 2002) demonstraram a influência do polimorfismo *PvuII* no íntron 15 do *LDLR* nas concentrações séricas de lipídios em indivíduos com baixo e alto risco para doença arterial coronariana (DAC). O P1P1 do polimorfismo *PvuII* do *LDLR* foi mais frequente em indivíduos com alto risco para DAC quando comparado aos controles (57% vs 38%, $p < 0,05$). Além disso, esses autores demonstraram uma forte associação entre o genótipo P1P1 e elevada concentração plasmática de CT, triglicerídeos (TG), LDL-C, fração da lipoproteína de densidade muito baixa (*very-low density lipoprotein*, VLDL-C) e baixa concentração plasmática da fração da lipoproteína de alta densidade (*high-density lipoprotein*, HDL-C), em comparação com os demais genótipos em indivíduos com alto risco para DAC. Similarmente, demonstraram que indivíduos do grupo controle (baixo risco para DAC) com o genótipo P1P1 apresentaram aumento da concentração de CT e LDL-C quando comparados aos indivíduos com outros genótipos (P1P2 e P2P2) (SALAZAR et al., 2000a, 2000b, 2002).

1.5 HEPATITE C, ESTRESSE OXIDATIVO E ALTERAÇÕES LIPÍDICAS

O HCV modifica os processos metabólicos do organismo infectado causando estresse oxidativo, alterações lipídicas e sobrecarga de ferro. Todos esses fatores levam a um pior prognóstico da infecção com resistência à terapia antiviral, hepatocarcinoma celular e fibrose (JAIN et al., 2002).

Atualmente, os mecanismos pelos quais o HCV causa dano celular não estão bem definidos, mas a ação deletéria do estresse oxidativo, representado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), tem sido implicada na fisiopatologia da infecção pelo HCV. Por serem instáveis e altamente reativas, essas

moléculas atacam a estrutura do DNA, de lipídios e de proteínas e a lipoperoxidação causada por esse ataque é um processo que pode iniciar a formação da fibrose hepática nos pacientes com HCC.

O estresse oxidativo ocorre quando a geração de radicais livres excede a quantidade de defesas antioxidantes das células a ponto de elas não conseguirem neutralizar tais moléculas. Essa alteração no balanço oxidante-antioxidante a favor dos oxidantes pode levar ao dano celular e à injúria tecidual. As células são protegidas contra o estresse oxidativo por moléculas como a glutathiona (GSH), a tioredoxina (Trx) e as enzimas antioxidantes, como o superóxido dismutase (SOD), a catalase, a GSH peroxidase e o heme oxigenase-1(HO-1) (HALLIWELL, 2012).

A replicação do HCV provoca aumento das EROs, que são altamente oxidantes. Duas proteínas virais – NS5A e core – são consideradas as principais causadoras desse aumento (GONG et al. 2001; ABDALLA et al. 2005). A NS5A é uma proteína que está associada com a membrana do retículo endoplasmático (RE), formando um complexo de ribonucleoproteínas necessário para a replicação e estabilidade da infecção do HCV. Esse complexo provoca a liberação de Ca^{++} do RE, que é transferido para a matriz mitocondrial, causando a elevação das EROs (GONG et al. 2001). Em relação às proteínas do core, o seu nível e tempo de expressão estão diretamente relacionados com a magnitude de formação das EROs (ABDALLA et al. 2005).

A sobrecarga de ferro que o HCV provoca, pelo aumento da expressão do receptor de transferrina 2 no intestino (TAKEO et al., 2005) e diminuição da hepcidina (NEMETH; GANZ, 2006), estimula ainda mais o estresse oxidativo, pois esse íon metálico é um cofator na reação de Fenton, responsável pela produção de radicais livres (HALLIWELL, 2005).

Venturini e colaboradores (2010) demonstraram que o soro de pacientes com HCV, não tratados, apresentaram níveis elevados de pró-oxidantes, enzimas hepáticas, ferritina, saturação da transferrina e menor capacidade antioxidante total plasmática e as substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) se correlacionaram positivamente com níveis de aspartato aminotransferase (AST) e de saturação da transferrina.

Tanto a replicação quanto a liberação do HCV dos hepatócitos dependem do metabolismo das lipoproteínas, o que causa alterações nos níveis plasmáticos e intracelulares dessas moléculas, levando ao desenvolvimento de esteatose hepática

(YE, 2007). O HCV leva ao acúmulo de lipoproteínas no citoplasma dos hepatócitos de diversas formas, tais como: 1) ativação de citocinas supressoras de sinais (SOCS) e do ativador de proteossoma (PA)-28 γ , que estimulam a proteína de ligação ao elemento de regulação de esterol 1 (SREBP1) a aumentar a síntese de lipídios; 2) produção de radicais livres, que peroxidam o VLDL-C e impedem sua saída da célula; 3) inibição do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (RAPP- γ) com conseqüente diminuição da degradação de ácidos graxos (MIYANARI et al. 2007).

Outra explicação para os níveis diminuídos de lipídeos no plasma dos pacientes infectados pelo HCV é que a proteína do core viral inibe a atividade da proteína de transferência microssomal de triglicerídeos (MTP), enzima responsável por unir os TG à apolipoproteína originando o complexo VLDL-TG que pode ser secretado pelo hepatócito (PERLEMUTER et al., 2002). Com a inibição desta via pelo HCV, os lipídeos se concentram dentro das células hepáticas e não são liberados para a circulação, o que acarreta seu acúmulo no fígado.

A infecção crônica pelo HCV tem sido associada a baixos níveis de CT e LDL-C (NEGRO; SANYAL, 2009; PETIT, 2003; SERFATY et al., 2001). Chen et al (2010) demonstraram que pacientes infectados pelo HCV apresentam baixa prevalência de hipercolesterolemia. Esses achados propõem que a infecção crônica pelo HCV está associada com o metabolismo de lipídeos e pode, dessa maneira, influenciar nos níveis de lipídeos dos pacientes com HCC.

O estudo realizado por Siagris et al. (2006) demonstrou que os pacientes com HCC tinham níveis séricos significativamente mais baixos de CT, HDL-C e LDL-C do que os adultos saudáveis, pareados por idade e sexo; observou-se, também, que o HCV, independente dos genótipos e subtipos, reduz os níveis de CT. A doença hepática resultante de infecção por HCV pode diminuir a síntese de VLDL-C nos hepatócitos, mas nessa população, a hipocolesterolemia não foi resultado da má função hepática, uma vez que pacientes cirróticos foram excluídos, comprovando que essa hipocolesterolemia associada à esteatose pode ser decorrente do HCV por meio de mecanismos relatados previamente (PERLEMUTER et al., 2002; MIYANARI et al., 2007).

1.6 EVOLUÇÃO DO TRATAMENTO PARA A HEPATITE C

A infecção pelo HCV é uma grave causa de morbidade e mortalidade no mundo. Entre as pessoas infectadas, 55-85% não conseguem eliminar o vírus e tornam-se portadores crônicos (HOOFNAGLE, 2002). O objetivo do tratamento é atingir a RVS definida como HCV-RNA, indetectável na 24ª semana de seguimento e após o término do tratamento (RIVERO-JUAREZ et al. 2012).

Segundo as recomendações atuais (SHARAFI; ALAVIAN 2011), o tratamento convencional dos pacientes infectados cronicamente pelo HCV é realizado com IFN- α , com o objetivo de recuperar a resposta imunológica inata do indivíduo. A adição de uma molécula de polietilenoglicol (peg) à molécula do IFN- α prolonga a sua ação, eleva a velocidade de absorção, aumenta a meia-vida e reduz o *clearance* do IFN- α . Dessa forma, aumenta a eficácia do medicamento. Na terapia dupla, esse medicamento é associado à RBV, um antiviral análogo de nucleosídeo. Ainda assim, a associação alcança uma RVS em apenas 50% dos pacientes tratados (SUPPIAH et al., 2009; TANAKA et al., 2009).

Recentemente, foi aprovado o uso de mais dois antivirais inibidores de proteases (IPs), o telaprevir e o boceprevir, que agem diretamente sobre o vírus, inibindo suas proteases. Com a terapia tripla, que é a terapia dupla convencional (peg-IFN- α /RBV) adicionada de um destes IPs, tem-se obtido melhores resultados, mas ainda permanece com baixa RVS quando se trata do HCV genótipo 1. Além disso, o uso dos IPs que agem diretamente sobre o HCV, o qual sofre mutações rapidamente, possibilita o surgimento de cepas resistentes (LIANG; GHANY, 2013).

Após mais de duas décadas do descobrimento da doença, o tratamento de pacientes com infecção crônica pelo HCV passou por grandes avanços. Entretanto, ainda é necessário entender melhor como o vírus interage com o hospedeiro, a fim de que se desenvolvam drogas mais eficazes e que resultem menos resistência viral.

2 JUSTIFICATIVA

Para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos e para o aperfeiçoamento do tratamento de pacientes infectados cronicamente pelo HCV é necessária uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos em todas as etapas do ciclo viral, em especial da sua entrada na célula e seus mecanismos patogênicos. Devido à necessidade do LDLR para a entrada do HCV no hepatócito, a estreita relação de ambos com o metabolismo de lipídios e pelo fato de, quando no interior da célula, as proteínas virais estimularem a produção de EROs, a determinação de variantes genéticas do *LDLR* em pacientes infectados pelo HCV pode fornecer dados para o melhor entendimento da fisiopatologia desta infecção e suas conseqüências metabólicas e, assim, contribuir para a identificação de um marcador genético associado às alterações metabólicas, ao melhor prognóstico e resposta terapêutica observadas nesta infecção, em indivíduos da população brasileira.

Estudos prévios desenvolvidos em diferentes populações mundiais, inclusive na população brasileira, demonstraram a influência da variante genética *PvuII* no intron 15 do *LDLR* no metabolismo de lipídios (HUMPHRIES et al., 1999; GUDNASON et al., 1998; SALAZAR et al. 2000; SALAZAR et al. 2002; FRIKKE-SCHMIDT et al. 2004). Recentemente, um estudo demonstrou associação entre este polimorfismo genético e dislipidemia em pacientes infectados pelo HIV-1 da população brasileira (DE ALMEIDA, et al., 2014). No entanto, até a presente data, não temos conhecimento da avaliação do *PvuII* no intron 15 do *LDLR* em indivíduos infectados cronicamente pelo HCV na população brasileira.

A hipótese do presente trabalho foi de que o genótipo P2P2 do polimorfismo *PvuII* do intron 15 do *LDLR* poderia resultar em aumento na expressão do LDLR na membrana dos hepatócitos e assim aumentar a entrada do HCV na célula, que por sua vez, levaria ao aumento do estresse oxidativo e lesão hepática nos pacientes que apresentassem este marcador genético.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar a associação entre o polimorfismo genético *PvuII* do intron 15 do *LDLR* e as alterações metabólicas, níveis plasmáticos de marcadores do estresse oxidativo e antígeno (Ag) core do HCV em pacientes infectados cronicamente pelo HCV, atendidos em Londrina e região.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência do polimorfismo genético do *PvuII* do intron 15 do *LDLR* em indivíduos infectados cronicamente pelo HCV e em indivíduos saudáveis;
- Determinar o perfil lipídico em indivíduos infectados cronicamente pelo HCV e em indivíduos saudáveis;
- Determinar os níveis de marcadores do estresse oxidativo em indivíduos infectados cronicamente pelo HCV e em indivíduos saudáveis;
- Avaliar a associação entre os genótipos do *PvuII* do intron 15 do *LDLR* com os marcadores de lesão hepática, de estresse oxidativo, de Ag core do HCV e com os níveis circulantes de lipídeos em indivíduos infectados cronicamente pelo HCV;
- Correlacionar os níveis de lesão hepática com os níveis de lipídeos, HCV Ag core nos pacientes com HCC, segundo os diferentes genótipos do *PvuII* do intron 15 do *LDLR*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos 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).

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo caso-controle para comparar dados entre pacientes e controles e um estudo transversal para a determinação da associação entre os genótipos do *PvuII* do intron 15 do *LDLR* com os marcadores de lesão hepática, de estresse oxidativo, de antígeno de core do HCV e com os níveis circulantes de CT, TG, LDL-C e HDL-C em indivíduos cronicamente infectados pelo HCV.

4.3 INDIVÍDUOS

Foram avaliados 46 pacientes com diagnóstico de infecção crônica pelo HCV acompanhados no Ambulatório de Hepatites Virais do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, no Centro de Testagem e Aconselhamento do município de Londrina (CTA) e no Consórcio Intermunicipal de Saúde do Médio Paranapanema (CISMEPAR). Os pacientes não estavam em tratamento para a infecção pelo HCV no momento da inclusão no estudo. O grupo controle foi composto por 87 doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina, atendidos entre junho de 2012 a julho de 2013. Os grupos foram controlados por sexo, etnia, idade, índice de massa corpórea (IMC), tabagismo e consumo de álcool. Nenhum dos indivíduos fazia uso de medicamentos hipolipemiantes ou suplementos vitamínicos e antioxidantes.

4.3.1 Critérios de Inclusão e Exclusão para os Pacientes

Inclusão: ter entre 18 e 67 anos, apresentar dois resultados com reatividade em testes sorológicos para anticorpos anti-HCV e carga viral RNA-HCV qualitativa ou quantitativa positiva, em amostras coletadas no período de seis meses de intervalo e ter assinado o TCLE.

Exclusão: ter abaixo de 18 ou acima de 67 anos; recusar em assinar o TCLE, carga viral negativa para RNA-HCV, apesar de resultado reagente nos testes para anticorpos anti-HCV; gestantes; pacientes com câncer, insuficiência cardíaca grave – classe funcional III e IV, diabetes *mellito* tipo 1, doença renal crônica, presença de sorologia reagente para HIV 1/2 ou para o vírus da hepatite B.

4.3.2 Critérios de Inclusão e Exclusão para os Controles

Inclusão: idade entre 18 e 67 anos, ter assinado o TCLE e ser apto à doação de sangue, segundo critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2004).

Exclusão: inaptidão para doação de sangue conforme critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2004).

4.4 AVALIAÇÕES DO ÍNDICE DE MASSA CORPORAL (IMC), CIRCUNFERÊNCIA ABDOMINAL E DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

Os pacientes foram pesados (kg) e medidos (m) e a partir destes dados calculou-se o IMC (kg/m^2). A circunferência abdominal foi aferida por fita métrica, sempre pelo mesmo avaliador e expressa em cm. A pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) foram determinadas com o indivíduo sentado após cinco minutos de repouso, com esfigmomanômetro aneroide e expressas em mmHg.

4.5 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE ÁLCOOL

Foi considerado etilista o paciente que referiu consumo de álcool maior que 30g/dia, de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2004).

4.6 AVALIAÇÃO DO TABAGISMO

Foi considerado tabagista o paciente que fumava, à época da avaliação, e que havia fumado pelo menos 100 cigarros na vida, de acordo com a Organização Pan americana de Saúde (OPAS, 2001).

4.7 MARCADORES BIOQUÍMICOS

Após jejum de 12 horas, os indivíduos foram submetidos à coleta de sangue periférico com e sem anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As amostras foram identificadas, consecutivamente, por número para garantir a confidencialidade e então centrifugadas a 3.500 rpm por 15 min. Após este procedimento, plasma e soro foram aliquotados 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 AST, alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (γ GT), CT, HDL-C, LDL-C, TG, ácido úrico e ferro por um auto-analisador bioquímico (Dimension AR DadeBehring, Deerfield, IL, EUA), segundo as instruções e valores de referência do fabricante. Os níveis séricos de ferritina foram avaliados por método de quimioluminescência (Architech™, AbbottLaboratory, Abbott Park, IL, USA), segundo as instruções e valores de referência do fabricante.

4.8 POLIMORFISMO GENÉTICO PVIII DO INTRON 15 DO LDLR

4.8.1 Extração do DNA genômico

Para a análise do polimorfismo genético do *LDLR*, amostras de sangue periférico foram obtidas dos indivíduos dos dois grupos estudados, por punção venosa, com tubos de coleta a vácuo contendo o anticoagulante EDTA. Os leucócitos foram separados por centrifugação a 2.000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente e o *buffy-coat* obtido foi mantido no *freezer* -20°C até o momento do processamento. O DNA genômico foi extraído com colunas de resina (BioPur, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), segundo as instruções do fabricante. A concentração e a integridade do DNA extraído foram verificadas por eletroforese em

gel de agarose 1%. Após a corrida a 100V, por 30 minutos, o gel foi submerso em uma cuba com tampão TAE 1x (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) contendo brometo de etídio (20 mg/mL) por 20 min e visualizado em transiluminador de ultravioleta (UV). O DNA extraído foi mantido no *freezer* a -80°C até o momento do seu uso.

4.8.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A determinação da frequência dos genótipos e variantes alélicas do *LDLR* foi realizada com o emprego dos métodos descritos previamente (GUDNASON et al., 1998; SALAZAR et al., 2000a). Para a amplificação do segmento de 800 pb do intron 15 do *LDLR*, foi utilizada a reação de PCR, usando os seguintes *primers*: *forward* 5' - TCC CCT TCA AAA TGC CCT CTT-3' e *reverse* 5'-AGC CAC CGA GCC CAG CCT AAG AA-3' (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

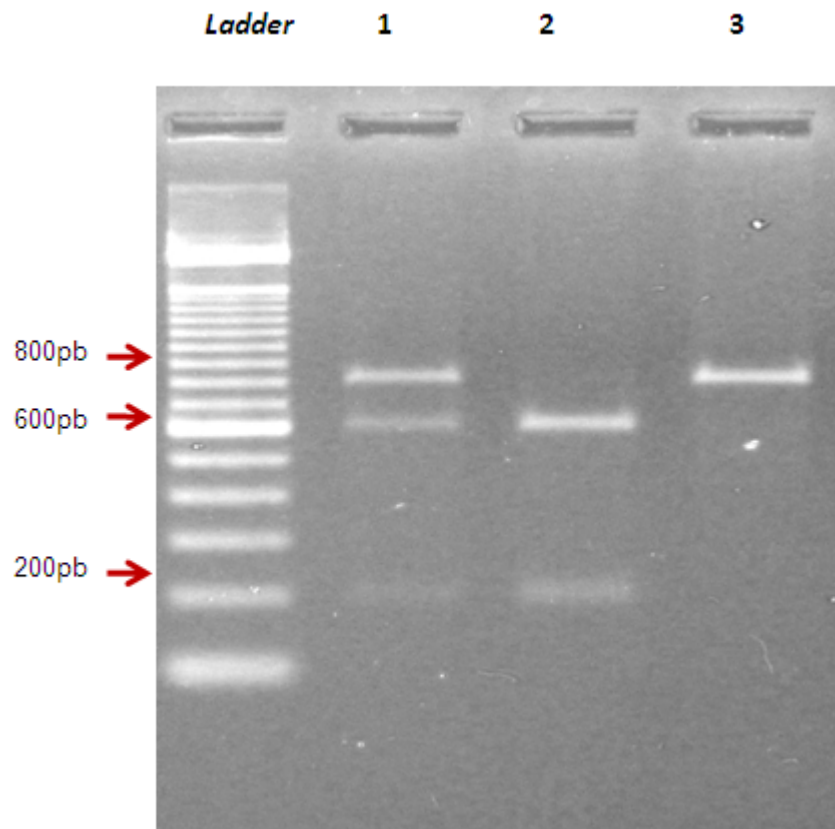
Uma amostra de 500 ng de DNA foi utilizada em 50 μL de reação de PCR contendo 75 mmol/L Tris-HCl (pH 9,0), 50 mmol/L KCl, 2,0 mmol/L MgCl_2 , 20 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 mmol/L trifosfato de deoxinucleotídeos, 0,2 mmol/L de cada *primer* e 1 U enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A reação foi realizada em termociclador (AppliedBiosystemsVeriti™ 96-Well ThermalCycler, Life Technologies, Foster City, CA, USA). As condições da PCR foram: 37 ciclos a 95°C por 45 segundos, a 62°C por 45 segundos, e a 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 min.

Todas as reações foram efetuadas com um controle negativo (ausência de DNA) para assegurar a ausência de contaminação, e com um controle positivo, no qual se utilizou DNA de amostra quantificada previamente e testada em outras reações de amplificação. Para a análise da amplificação do gene *LDLR*, 5 μL do produto de PCR e 5 μL do corante X-C foram aplicados no gel de agarose 1%. Após a corrida a 100V, por 30 minutos, o gel foi submerso em uma cuba com tampão TAE 1x (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) contendo brometo de etídio (20 mg/mL) por 20 min e visualizado em transiluminador de UV. Em cada eletroforese foi incluído o controle positivo do fragmento de 800 pb do *LDLR* amplificado e padrão peso molecular de 100 pb (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

4.8.3 Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP)

O produto de PCR sofreu digestão pela enzima de restrição *PvuII* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para a determinação dos genótipos. A digestão foi realizada pela adição de 5 U de *PvuII* a 10 µL do produto obtido na PCR, em solução tampão, como recomenda o fabricante da enzima, incubada a 37 °C por quatro horas. Os fragmentos resultantes foram separados por eletroforese em gel de agarose 3%, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador com luz UV. A digestão de 800 pb do produto amplificado com a enzima de restrição *PvuII* formou dois fragmentos, de 600 e 200pb, indicando a presença do sítio de restrição (alelo P2). O alelo P1 foi identificado por uma banda de fragmento de 800 pb, indicando a ausência do sítio de restrição. O genótipo em heterozigose foi identificado pela presença de três bandas: 800, 600 e 200 pb (Figura 2). Uma amostra com o alelo P2 em homozigose, genótipo P2P2, para o *LDLR* foi inserida como controle positivo. Todas as leituras de géis foram realizadas por duas pessoas e 10% das análises foram repetidas randomicamente. As imagens dos géis obtidos com os procedimentos 4.5.1, 4.5.2 e 4.5.3 foram capturadas e armazenadas pelo sistema de fotodocumentação L-PIX-HE (LoccusTechnology, Cotia, Brasil).

Figura 2 – Perfil de PCR-RFLP para o polimorfismo *PvuII* (intron 15) do gene receptor de lipoproteína de baixa densidade (*LDLR*) em gel de agarose 3%.



Ladder: marcador molecular de 100pares de bases (pb); 1: genótipo P1P2, heterozigoto para o sítio de restrição, com fragmentos de 800, 600 e 200 pb; 2: genótipo P2P2, homozigoto para o sítio de restrição, com fragmentos de 600 e 200 pb; 3: genótipo P1P1, homozigoto para a ausência do sítio de restrição com fragmento de 800 pb.

4.9 MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO

Para avaliar o estresse oxidativo, amostras de sangue periférico foram coletadas utilizando EDTA como anticoagulante. O material foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos e alíquotas do plasma foram armazenadas no *freezer* a -80 °C até o momento de uso.

4.9.1 Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter (TRAP)

Determinou-se a capacidade antioxidante total do plasma pelo método do TRAP. Nesta análise, avalia-se a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes na amostra biológica que resulta em um parâmetro integrado capaz de revelar alterações no delicado equilíbrio redox existente *in vivo*. Esta técnica

quantifica antioxidantes hidro e lipossolúveis presentes no plasma, por meio de QL, 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, período no qual a oxidação é inibida e comparada ao do Trolox (Aldrich Chemicals, New Jersey, EUA) análogo hidrossolúvel da vitamina E, usado como antioxidante de referência e quantitativamente relacionado a capacidade antioxidante total do plasma. Os valores de TRAP foram expressos em μM Trolox.

4.9.2 Determinação de Hidroperóxidos Lipídicos Iniciados por t-butil (CL-LOOH)

CL-LOOH no plasma foi avaliada baseado como descrito anteriormente (GONZALES-FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991). O método CL-LOOH é considerado muito mais sensível e específico do que a medição por TBARS, o método usual para determinar a oxidação lipídica. A mistura da reação incluía 125 μL de plasma, 865 μL de tampão fosfato dissódico (Na_2HPO_4) 20 μM (pH 7,4) e 20 μL de tert-butilhidroperóxido 20 μM . CL-LOOH foi medida em luminômetro (Glomax™-96 well 20/20 Luminometer, Promega Corporation, Madison, WI, USA) durante uma hora. Os resultados foram expressos em unidades relativas de luz (URL).

4.9.3 Advanced Oxidation Protein Products (AOPP)

AOPP foi determinada no plasma, utilizando o método descrito previamente (WITKO-SARSAT et al., 1996). Produtos avançados da oxidação protéica resultam da oxidação de resíduos de aminoácidos, tais como a tirosina, e detectados por espectrofotometria. As concentrações de AOPP foram expressas como micromoles por litro ($\mu\text{mol/L}$) de equivalentes de cloramina-T.

4.9.4 Índice de Estresse Oxidativo (Oxidativestress Index, OSI)

Foi calculado por meio da razão entre AOPP/TRAP.

4.10 ÍNDICE DE AST E PLAQUETAS (*AST TO PLATELETRATIO INDEX*, APRI)

APRI é um índice simples que consiste de dois resultados laboratoriais prontamente disponíveis como o valor sérico de AST e contagem de plaquetas. Este índice pode prever fibrose de maneira significativa, com área sob *Receiver Operating Characteristic* (ROC)=0,88 e cirrose com área sob ROC=0,94 em pacientes com HCC virgens de tratamento com alto grau de precisão. Para pacientes com APRI de 0,50 ou menos, 85 % não apresentam fibrose significativa e nos pacientes com APRI superior a 1,50, 88 % apresentam fibrose significativa. O APRI é calculado como $\text{AST} / \text{limite superior do intervalo} / \text{contagem de plaquetas normal} (10^9/\text{L}) \times 100$ (WAI et al., 2003). Para tanto, foi realizada a contagem de plaquetas, em amostras do sangue periférico coletado com EDTA, em contador automatizado.

4.11 DETERMINAÇÃO DO AG CORE DO HCV (AG CORE HCV)

O Ag core HCV foi quantificado em amostras de soro pelo imunoenensaio de micropartículas por quimioluminescência HCV (Architech™, AbbottLaboratory, Abbott Park, IL, USA). Amostras com valores superiores ou iguais a 3,0 fmol/L foram consideradas “reagente” para Ag core HCV.

4.12 DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL E GENÓTIPO DO HCV

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

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realização da estatística foi utilizado o programa *GraphPadPrism* versão 3.0. As variáveis categóricas foram expressas em número absoluto (n) e porcentagem (%) e analisadas pelo teste Exato de Fisher ou teste de Qui-Quadrado,

quando apropriados. As variáveis contínuas foram expressas em mediana e variação interquartil (IQR) de 25% e 75% e analisadas pelo teste não paramétrico de Mann Whitney, com posterior análise multivariada. Para a determinação das correlações foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Os valores de *oddsratio* (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% foram demonstrados. O equilíbrio de Hardy- Weinberg na distribuição das frequências genotípicas foi avaliado por meio do teste do Qui-quadrado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

Artigo científico submetido para: Scandinavian Journal of Infectious Diseases

P2 allele of *PvuII* genetic polymorphism of *low-density lipoprotein receptor* increase oxidative stress and liver injury in chronic hepatitis C patients

Lucas S Liberati¹, Jorge PS de Almeida¹, Elaine RD de Almeida², Fernanda EN Barros¹, Ana P Kallaur¹, Jan W Stegmann³, Edvilson C Lentine³, Dennis A Bertolini⁴, Isaias Dichi⁵, Andrea NC Simão², Edna M V Reiche²

¹Postgraduate Program of Health Sciences, Health Sciences Center, University of Londrina, Av. Robert Koch, 60, CEP 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil.

²Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, University of Londrina, Av. Robert Koch, 60, CEP 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil.

³Integrated Center of Infectious Diseases of 17^a Secretariat of Health of Paraná, Londrina, Paraná State, Av. Manoel Ribas, 1, Londrina, Paraná, Brazil.

⁴Department of Clinical Analysis, Health Sciences Center, University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil;

⁵Department of Internal Medicine, Health Sciences Center, University of Londrina, Av. Robert Koch, 60, CEP 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil.

Keywords: genetic polymorphism; hepatitis C virus; low-density lipoprotein receptor (LDLR); oxidative stress; APRI

Running headline: *PvuII*LDLR polymorphism and HCV infection

Correspondence author: Edna Maria VissociReiche, Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, University of Londrina, Av. Robert Koch, 60, CEP 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil. Phone/FAX number: +55-43-3371-2619. e-mail: reiche@sercomtel.com.br

Conflict of Interest Statement

All the authors declare that there is no conflict of interest.

Abstract

Background: The aim of this study was to evaluate the influence of *PvuII* intron 15 *low-density lipoprotein receptor (LDLR)* polymorphism on liver injury, oxidative stress, and hepatitis C virus (HCV) core antigen in individuals chronically infected with HCV.

Methods: Forty-six consecutive untreated chronic HCV patients and 87 healthy controls were evaluated with biochemical markers, such as aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyltransferase (γ GT), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein (LDL-C), high-density lipoprotein (HDL-C), triglyceride, uric acid, ferritin, iron, AST-to-platelet index (APRI) and with the viral marker HCV core antigen. Oxidative stress markers were also evaluated including tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH), advanced oxidation protein products (AOPP), oxidative stress index (OSI), and total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP). The *PvuII* *LDLR* polymorphism was genotyped using PCR-RFLP. Further, the patients were divided in two groups, carriers and non-carriers of the P2 allele.

Results: The patients showed higher AST, ALT, γ GT, ferritin, iron, hydroperoxide, and OSI, and lower TC, LDL-C ($p < 0.0001$), triglycerides ($p = 0.0395$), and TRAP ($p = 0.0302$) than controls. Patients carrying the P2 allele exhibited higher AST ($p=0.0438$), ALT ($p=0.0271$), hydroperoxide ($p=0.0398$), and APRI ($p=0.0265$), and lower HCV core antigen ($p=0.0235$) than those with the P1P1 genotype.

Conclusions: The P2 allele of *PvuII* intron 15 *LDLR* polymorphism was associated with increased oxidative stress and liver injury, as well as with decreased HCV core antigen, suggesting that this genetic variant may influence viral replication and oxidative stress, and therefore, could contribute to liver injury in chronically HCV-infected patients.

Keywords: genetic polymorphism, hepatitis C virus, low-density lipoprotein receptor, oxidative stress, APRI

Introduction

Hepatitis C (HC) is an infectious disease recognized as the principal cause of chronic liver disease. Currently, it is estimated that 3% of the population worldwide is infected with hepatitis C virus (HCV). It means that, approximately, 170 million people are supposed to be chronically infected and at risk of developing further complications, such as cirrhosis (10-20%) and liver cancer (1-5%), after 20-30 years of infection [1,2].

The involvement of oxidative stress in the pathogenesis of HCV infection and hepatocellular carcinoma has been strongly suggested [3]. Oxidative stress is produced by inflammatory processes that occur in HCV infection through immunopathological mechanisms. Chemokines and chemotactic cytokines that attract leukocytes to inflammatory sites are important in the development of intrahepatic inflammation and liver cell injury [4]. In addition, in HCV infection, some role has been assigned to viral proteins in the induction of oxidative stress [5,6].

HCV consisting of structural proteins, such as core, envelope proteins (E1 and E2), and p7, and non-structural (NS) proteins, such as NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B. The strong association of oxidative stress, produced by the viral proteins NS5A and core, with HCV infection has been demonstrated recently and it has become possible to explain at least part of the clinical progression of the disease [5,6].

The HCV infects cells through interactions between its proteins with host cellular receptors. When the virus is associated with apolipoproteins is called

lipoviroparticles (LVPs) that represent 77% of the virus in the circulation and have a greater infectivity [7,8]. The LVPs interacts with the low-density lipoprotein receptor (LDLR) expressed of hepatocytes [9-11], and this pathway has been reported as a mean of HCV cell entry.

Mutations were detected in different domains of the *LDLR* and have distinct impact on LDLR structure and function [12]. Polymorphisms within the *LDLR* gene have been studied in attempt to associate them with the evolution and treatment of CHC [13,14], as this receptor, besides being responsible for cholesterol homeostasis, is also one of those that allow HCV cells entry [15-17]. Previous study showed that virus entry and binding are correlated to the LDLR activity [15].

The *PvuII* polymorphism is located in the intron 15 of the *LDLR* and may exert an indirect effect on cholesterol metabolism, probably by increasing the mRNA stability, activity, or increasing the number of LDLR on the cell surface. The *PvuII* *LDLR* polymorphism has been evaluated in different population worldwide [18-21].

Previous evidences showed the close relationship between HCV proteins and oxidative stress, as well as the LDLR is a key surface receptor for HCV entry into hepatocytes [9,11,15, 16]. Considering the hypothesis that individuals carrying the P2 allele of the *PvuII* *LDLR* intron 15 polymorphism could exhibit higher expression of LDLR than those with P1 allele [18-20], the aim of this study was to evaluate the influence of this genetic variant on oxidative stress, plasma levels of HCV core antigen (Ag), and liver damage markers in patients with CHC.

Methods

Design, subjects, and blood samples

The study was approved by the Institutional Ethics Committee on Research Involving Human Subjects of State University of Londrina (UEL) and a written consent form was obtained from all of the individuals. Firstly, a case-control study was carried out with 46 chronically HCV-infected adults patients and 87 healthy blood donors from Regional Blood Bank of Londrina to evaluate the association between the HCV infection and biochemical, viral, stress oxidative, and liver damage markers. Further, a cross-sectional study was conducted to determine the association between the genotypes of *PvuII* polymorphism in the intron 15 of *LDLR* with these markers in individuals chronically infected with HCV.

The patients were attended at the Hepatitis Outpatient Clinic of the University Hospital of UEL, from June 2012 to July 2013 and presented seropositivity for anti-HCV serological test assayed using chemiluminescence microparticle immunoassay (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA), and positivity for quantitative RNA-HCV viral load in two samples obtained in a period of six months. The patients had no evidence of liver disease due to other causes. The control group was age, sex, ethnicity, body mass index (BMI), waist circumference (WC), and smoking controlled; moreover, they presented normal aminotransferases, normal blood counts, and negative markers for viral hepatitis and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). All the individuals enrolled reported not drink alcohol regularly and no use of lipid-lowering, vitamin supplements, and antioxidant therapies. Exclusion criteria included pregnant women, individuals with co-infection with hepatitis B virus or HIV-1, malignancies, severe heart disease, type 2 diabetes mellitus, and chronic renal disease.

Demographic, epidemiological, anthropometric, and clinical data with recording of the use of any therapeutic drugs before the inclusion in this study were

obtained using a standard questionnaire at the admission. The anthropometric measures were body weight and height reported by the individuals. BMI was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. The ethnicity was self-reported as Caucasian and non-Caucasian.

Peripheral blood samples were collected at the admission with and without EDTA as anticoagulant. The buffy-coat, plasma, and serum samples were immediately separated by centrifugation (2,500 rpm for 15 min) and stored in aliquots at -80°C.

Biochemical markers

Levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and gamma glutamyltransferase (γ GT), total cholesterol (CT), high-density lipoprotein (HDL-C), low-density lipoprotein (LDL-C), triglyceride, uric acid, and iron were analysed using a biochemical autoanalyzer (Dimension AR Dade Behring, Deerfield, IL, EUA) according to the instructions and manufacturer's reference values. Serum ferritin was measured using chemiluminescencemicroparticle immunoassay (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

Aminotransferase-to-platelet ratio index (APRI)

APRI is a simple index and consists of two readily available laboratory results, such as 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 CHC patients with a very high degree of accuracy. For patients with APRI of 0.50 or less, 85% would not have significant fibrosis and patients with APRI greater than 1.50, 88% would have significant fibrosis. The platelet count was assayed from

peripheral blood samples obtained with EDTA as anticoagulant. APRI was calculated as $AST/\text{upper limit of normal range platelet count } (10^9/L) \times 100$ [22].

Quantification of HCV core Ag

The HCV core antigen was quantified using chemiluminescent microparticle immunoassay (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA) and serum sample that exhibited result greater than or equal to 3.0 fmol values/L was considered positive for HCV core Ag.

Determination of RNA-HCV viral load and genotype

RNA-HCV viral load of patients was carried out using quantitative transcriptase reverse polymerase chain reaction (RT-PCR) and HCV genotyping was assayed using PCR by amplifying the viral core genome region (COBAS AMPLICOR, Roche Diagnostics, Branchburg, NJ).

Genomic DNA Extraction and PvuII LDLR Polymorphism Genotyping

Genomic DNA was extracted from the buffy coat using the reagent resin column (Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Brazil) according to the manufacturer's instructions. The *LDLR* gene was amplified from 100-200 ng of genomic DNA using PCR and specific primers determined in accordance with previous studies [18,19], as follow: primer forward 5' -TCC CCT TCA AAA TGC CCT CTT-3'; primer reverse 5'-AGC CAC CGA GCC CAG CCT AAG AA-3' (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). PCR was performed in a thermocycler (Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Life Technologies, Foster City, CA, USA).

Ten microliters of PCR product were digested completely with 0.3 uL of *PvuII* enzyme, 10 U/uL (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 4 h at 37 °C. The genotypes of the *PvuII* polymorphism were identified with restriction fragment length polymorphism (RFLP) method using electrophoresis on 3% agarose gel (70V, 70 min) after staining with ethidium bromide [23]. The site of *PvuII* restriction enzyme (CAG ↓ CTG) is created by substitution of a C for T within the sequence CAGCCG in a position approximately 900 bp from the 3' end of the exon 16. This variant allele site includes P2 restriction enzyme, resulting in fragments of 200 bp and 600 bp after digestion; P1 allele is identified with a fragment with 800 bp, and P1P2 heterozygote genotype is identified with three fragments (800 bp, 600 bp and 200 bp). The PCR-RFLP profiles were captured and recorded by the photo documentation system L-PIX -HE (LoccusBiotecnologia, Cotia, SP, Brazil) (Figure 1).

Oxidative Stress Markers

Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter (TRAP)

The total plasma antioxidant capacity was determined using TRAP method. This analysis assesses the cumulative action of all antioxidants present in the biological sample which results in an integrated capable of revealing changes in the delicate balance existing in vivo redox parameter. This technique quantifies the hydrosoluble antioxidant present in the plasma through chemiluminescence as previously described [24]. The TRAP values were corrected by the uric acid serum levels and expressed as mMTrolox/UA mg/mL.

Analysis of Tert-Butyl Hydroperoxide-Initiated Chemiluminescence (CL-LOOH)

A chemiluminescence-based method was employed to evaluate oxidative stress from plasma samples [25]. The reaction mixture contained 125 μL of plasma, 865 μL of disodium phosphate buffer (Na_2HPO_4) at 20 μM (pH 7.4) and 20 μL of tert-butyl hydroperoxide 20 μM . Readings were performed in a microplate luminometer (Glomax™-96 20/20 Luminometer, Promega Corporation, Madison, WI, USA) over 1 h at 1 reading/s. Results were expressed as relative units of light (RUL).

Determination of advanced oxidation protein products (AOPP)

AOPP was determined in the plasma samples using the semi-automated method previously described [26]. Briefly, AOPP resulting from oxidation of amino acid residues, such as tyrosine, leading to the formation of dityrosine products were detected using spectrophotometry. AOPP concentrations were expressed as $\mu\text{mol/L}$ of chloramine-T equivalents.

Oxidative stress index (OSI)

The OSI was calculated as the AOPP/TRAP ratio.

Statistical Analysis

GraphPadPrism version 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) was used to carry out the statistical analysis. Categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%) and were analyzed using Fisher's exact test or chi-square test. Continuous variables were expressed as median and interquartile range 25% and 75% (IQR) and were evaluated using non-parametric test of Mann Whitney. The variables that present significant association were assessed using multivariate analyzes. Spearman's rank correlation was performed to evaluate the

correlation between the APRI and the biochemical and oxidative stress markers. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were also demonstrated. The Hardy-Weinberg Equilibrium was evaluated in both groups of individuals using Chi-square test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Demographic, anthropometric, and biochemical features of patients chronically infected with HCV and controls included in the study are presented in the Table I. As expected, due to the control of these variables, there was no difference among the individuals in terms of age ($p=0.9262$), sex ($p=0.1227$), ethnicity ($p=0.1271$), BMI ($p=0.3205$), and WC ($p=0.5278$). Regarding the lipid profile, significantly lower values of triglycerides, TC, HDL-C, and LDL-C levels were observed among the CHC patients compared to controls ($p = 0.0395$, $p < 0.0001$, 0.0388 , and $p < 0.0001$, respectively). Patients with CHC exhibited higher levels of AST, ALT, and γ GT ($p < 0.0001$) than controls. Moreover, the levels of iron and ferritin were higher in CHC patients than controls ($p = 0.0019$ and $p < 0.0001$, respectively).

The results of the evaluation of oxidative stress markers are shown in Table II. CHC patients showed significantly higher levels of hydroperoxides and lower TRAP compared to controls ($p = 0.0067$ and 0.0302 , respectively). Although the AOPP levels did not differ between patients and controls, patients showed elevated levels of OSI than controls ($p < 0.0001$).

Regarding the *PvuII* intron 15 *LDLR* polymorphism, the distribution of the genotypes was in Hardy-Weinberg Equilibrium in both groups and did not differ among them ($p > 0.05$). The frequencies of P1P1, P1P2, and P2P2 genotypes obtained among the CHC patients were 58.7%, 34.8%, and 6.5%, respectively; and

among the controls were 54.0%, 43.7%, and 2.3%, respectively (OR: 1.226, 95% CI 0.7002-2.146, $p=0.583$). The P1 and P2 allelic frequencies were 0.7608 and 0.2391 among the HCV-infected patients and 0.7586 and 0.2413 among the controls, respectively (OR 1.000, 995% CI: 0.5225-1.914, $p=1.000$) (data not shown).

Clinical and laboratory features of CHC patients, according to the *PvuII* polymorphism in intron 15 of the *LDLR* are presented in Table III. Due to the small number of individuals with the P2P2 genotype, the dominant model has been used for statistical analysis comparing the variables of the study according to the P1P1 vs P1P2 + P2P2 genotypes. There was no difference among the individuals in relation to age ($p=0.9433$), sex ($p=0.8325$), ethnicity ($p=0.6195$), and disease duration ($p=0.1302$). Patients carrying the P1P2 + P2P2 genotypes exhibited higher levels of ALT and AST ($p=0.0438$ and $p=0.0271$, respectively) and APRI ($p=0.0265$) than those with the P1P1 genotype. HCV core Ag levels were lower in patients carrying the P1P2 + P2P2 genotypes compared with those observed in patients with P1P1 genotype ($p=0.0235$). Regarding the oxidative stress markers, significant differences were observed in the levels of hydroperoxide that were higher in HCV-infected patients carrying the P1P2 + P2P2 genotypes than in patients carrying the P1P1 genotype ($p=0.0398$) (Table IV). In a multivariate analysis, the HCV core Ag was independently associated with the P1P2 + P2P2 genotypes ($p=0.0183$) (data not shown).

Using the Spearman's rank correlation between APRI and the lipid serum levels, independently of the *PvuII**LDLR* polymorphism, TC and LDL-C levels were negatively correlated with APRI of the HCV-infected patients ($r=-0.440$, $p=0.0354$, and $r=-0.570$, $p=0.045$, respectively). When these correlations were

assessed according to the *PvuII*LDLR genotypes, significant results were not obtained (data not shown).

Discussion

This is the first study, to our knowledge, that describes the relationship between the *PvuII* genetic polymorphism in the intron 15 of the *LDLR* with the stress oxidative markers, HCV core Ag, and APRI in chronically untreated HCV-infected patients. No difference was found in the *PvuII* *LDLR* genotypes and alleles distribution when patients and controls were compared; however, when the patients were evaluated according to their genetic variant, those carrying the P2 allele (P1P2 + P2P2 genotypes) exhibited higher levels of liver injury and oxidative stress than those non carrying the P2 allele (P1P1 genotype). Patients carrying the P2 allele (P1P2 + P2P2 genotypes) presented higher levels of AST, ALT, APRI, and hydroperoxide, and lower levels of HCV core Ag than those with the P1P1 genotype.

Comparing with the P1P1 genotype, P1P2 + P2P2 genotypes could be associated with higher *LDLR* transcriptional activity, higher lipid molecules and LVPs capture by the hepatocytes, triggering higher viral replication with increased HCV within the hepatocytes, leading to an increase of oxidative stress and liver damage.

Previous studies evaluated different *LDLR* polymorphisms in patients infected with HCV [13, 14]; however, none of them included the *PvuII* *LDLR* located in the intron 15, as assayed in the presented study. One study described an association between an amino acid change in exon 8 of *LDLR* with severity of fibrosis, a correlation between a single nucleotide polymorphism (SNP) in exon 10 with viral clearance and overall inflammation, and a possible influence of a SNP in the 3'UTR in the treatment response [13]. Other study did not provide the evidence for a role of

11 different loci located in intron regions of the *LDLR* in the response of antiviral treatment in patients with HCV genotype [14].

The results obtained in the present study underscored that HCV infection is associated with changes in lipid profile, with decreased levels of CT, triglycerides, and LDL-C, as reported by previous studies [27-29]. Additionally, the levels of LDL-C and TC were negatively correlated with APRI in the HCV-patients, indicating a worse liver injury in these patients. Moreover, the patients showed increased levels of hydroperoxide and OSI and decreased TRAP, results in agreement with previous reports of an imbalance in the redox status associated with CHC [5,6].

The hypocholesterolemia and hypotriglyceridemia presented by the HCV-patients of the present cohort are also in agreement with previous studies suggesting the lipid profile as a marker of the HCV therapy response [27-29]. The HCV lifecycle depends on the lipid metabolism of the host cells for the viral replication, and for hepatocyte entry [16] and one explanation for the decreased levels of plasma lipids in HCV-infected patients is that the core viral protein inhibits the microsomal triglyceride transfer protein (MTP) activity, responsible for the link of the triglyceride to the apolipoprotein to form the very low-density lipoprotein (VLDL), that can be secreted by the hepatocyte [30]. With the inhibition of this pathway by the HCV core protein, the lipids are not released to the blood stream accumulating in the hepatocytes.

The high levels of iron and the inflammatory process of the HCV infection explain the higher levels of ferritin, an acute phase protein, in the HCV-infected patients than in controls. The ferritin level is considered one independent predictor of severe liver fibrosis in patients with CHC and the iron excess has been a pathological characteristic in the HCV-infected patients and is associated with advanced liver fibrosis [31]. Studies have been reported that the HCV, by itself, stimulates the

accumulation of iron through the hepcidin inhibition [32]. The increased iron levels can contribute to the worse clinical course of the HCV infection due this molecule is a cofactor in the reactions that produce free radicals, named as Fenton' reaction [33]. The causes of oxidative stress in the HCV infection include damage in the mitochondria and endoplasmic reticulum and accumulation of lipid and iron in the hepatocytes [3].

Iron and ferritin levels did not differ according to the *Pvull* genotypes of the HCV-infected patients of the present study. Therefore, the increased oxidative stress observed among them may not be due the iron metabolism. Probably, the significant difference on the oxidative stress may be due the increased HCV within the hepatocytes. The low levels of HCV core Ag independently associated with the *Pvull LDLR* genotypes underscore this hypothesis.

Regarding the oxidative stress markers evaluated in the present study, the results demonstrated an imbalance of the redox status, with increased oxidant and decreased antioxidant markers. These results are in agreement with previous studies that demonstrated the effect of HCV replication, mainly the core and NS5A HCV proteins, inducing an increase of species oxygen reactive [5,6].

The AOPP levels were not elevated in the present HCV-infected patients and some previous evidences could explain this result. First, selective degradation of AOPP is made by the proteasome in which mildly oxidized proteins are readily degraded [34]. Second, the AOPP is mainly derived from oxidation-modified albumin, as well as fibrinogen and lipoproteins [35] and with the advanced liver injury, the low levels of albumin and fibrinogen could be responsible, in part, by the low levels of AOPP. And third, an increased plasma AOPP levels were found in CHC patients, particularly in the diabetic CHC group [36], suggesting that the presence of diabetes

but not CHC infection was associated with increased circulating concentrations of AOPP in patients with CHC. All these previous evidences may support the results of AOPP obtained in the present study.

All the changes that were found in the CHC patients of the present study have in common the etiologic agent of the infection with the direct role of the HCV proteins. Therefore, factors that may modify the HCV cell entry, such as the change in the LDLR expression in the hepatocytes, may influence the level of the liver injury.

The distribution pattern of the *PvuII* *LDLR* genotypes obtained in the present cohort of HCV-infected patients seems to be similar from controls and other Caucasian individuals worldwide [22, 37-38]. Our findings were also consistent with previous studies that suggested an association between P2 allele of the *PvuII* *LDLR* polymorphism and subsequent LDLR increased expression [23]. As the LDLR is a receptor to the virus entry into hepatocytes [15], the carriers of the P2 allele should have lower concentration of HCV core Ag in the circulation; moreover, the virus would be more concentrated in the liver tissue creating an increased oxidative stress and cell injury, that are demonstrated by the high levels of liver enzymes and oxidative stress markers [39], and APRI.

The only discordant finding observed in the current study was the higher LDL-C levels exhibited by the CHC patients carrying the P1P1 genotype in comparison with P1P2+P2P2 genotypes, and this result could be explained, in part, by the fact that the LDL-C levels are not changed uniquely by the *PvuII* *LDLR* intron 15 variation. Actually, this SNP was reported to explain 9.6% of the sample variance in the LDL-C levels [37]. Additionally, there are influences of diet, sedentary lifestyle, and several polymorphisms in *LDLR* gene and in other genes, such as *APO B*, the *APOE-C1-C4-C2* cluster, *CELSR2*, *HMGCR*, *PCSK9*, and *CILP2* that modulate the LDL-C [40].

Some limitations deserve mentioning. First, the small number of participants, due to the rigorous inclusion criteria used in the study, which might have resulted in weaker association among some of the parameters. Secondly, liver biopsy were not performed in all CHC patients. However, this analysis could be, at least, partially substituted by the APRI index. Finally, the *PvuII* was the only *LDLR* genetic polymorphism evaluated in the present cohort and other variants of *LDLR* as well as of other genes should be performed to determine whether genetic factors are associated with different clinical outcome of the CHC.

Taken together, the results demonstrated that the P2 allele of the *PvuII* polymorphism the intron 15 of *LDLR*, which was associated with high oxidative stress in CHC patients, may exert a negative effect on HCV viral load and a positive effect on liver injury and disease outcome. This genetic variant could be a candidate gene to identify the individuals with high risk for developing oxidative stress and liver injury that could be benefit with specific therapy approaches for these HCV-associated effects. Further studies are wanted to confirm whether this genetic variant exerts a significant role in the pathophysiology and outcome of HCV infection.

Acknowledgments

The study was supported by grants from Coordination for the Improvement of Higher Level of Education Personnel (CAPES) of Brazilian Ministry of Education; Institutional Program for Scientific Initiation Scholarship (PIBIC) of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); and State University of Londrina (PROPPG). We thank the University Hospital of State University of Londrina for technical supports.

References

- [1]. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 2013; 57:1333–42.
- [2]. Bostan N, Mahmood T. An overview about hepatitis C: a devastating virus. *Crit Rev Microbiol* 2010; 36:91–133.
- [3]. Koike K, Miyoshi H. Oxidative stress and hepatitis C viral infection. *Hepatol Res* 2006; 34:65–73.
- [4]. Zeremski M, Petrovic LM, Tahal AH. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. *J Virol Hepat* 2007; 14:675-87.
- [5]. Abdalla MY, Ahmad IM, Spitz DR, Schmidt WN, Britigan BE. Hepatitis C virus-core and non structural proteins lead to different effects on cellular antioxidant defenses. *J Med Virol* 2005; 76:489–97.
- [6]. Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui a. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:9599–604.
- [7]. Steinmann E, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses* 2010; 2:2078–95.
- [8]. Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, et al. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 2003;77:5487–92.
- [9]. Bartosch B, Dubuisson J. Recent advances in hepatitis C virus cell entry. *Viruses* 2010; 2:692–709.
- [10]. Burlone ME, Budkowska A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* 2009; 90:1055–70.

- [11]. Diedrich G. How does hepatitis C virus enter cells? *FEBS J* 2006; 273:3871–85.
- [12]. De Castro-Orós I, Pampín S, Bolado-Carrancio A, De Cubas A, Palacios L, Plana N, et al. Functional analysis of LDLR promoter and 5' UTR mutations in subjects with clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 2011;32:868–72.
- [13]. Hennig BJW, Hellier S, Frodsham AJ, Zhang L, Klenerman P, Knapp S, et al. Association of low-density lipoprotein receptor polymorphisms and outcome of hepatitis C infection. *Genes Immun* 2002; 3: 359–67.
- [14]. Tanwandee T, Pithukpakorn M, Vipatakul N, Charatcharoenwitthaya P, Chainuvati S, Nimanong S, et al. Genetic polymorphism of low-density lipoprotein receptor did not affect treatment outcome of chronic hepatitis C genotype 3. *J Med Assoc Thai* 2011;94:S147-53.
- [15]. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang Q-X. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96:12766–71.
- [16]. Ye J. Reliance of host cholesterol metabolic pathways for the life cycle of hepatitis C virus. *PLoS Pathog* 2007; 3:1017–22.
- [17]. Petit J-M, Minello A, Duvillard L, Jooste V, Monier S, Texier V, et al. Cell surface expression of LDL receptor in chronic hepatitis C: correlation with viral load. *Am J Physiol Endocrinol metab* 2007; 293:E416-20.
- [18]. Salazar LA, Cavalli SA, Hirata MH, Diament J, Forti N, Giannini SD, et al. Polymorphisms of the low-density lipoprotein receptor gene in Brazilian individuals with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:1301–4.

- [19]. Gudnason V, Zhou T, Thormar K, Baehring S, Cooper J, Miller G, et al. Detection of the low density lipoprotein receptor gene PvuII intron 15 polymorphism using the polymerase chain reaction: association with plasma lipid traits in healthy men and women. *Dis Markers* 1998;13:209–20.
- [20]. Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Nakandakare ER, Forti N, Diament J, et al. Molecular basis of familial hypercholesterolemia in Brazil: Identification of seven novel LDLR gene mutations. *Hum Mutat* 2002; 19:462–3.
- [21]. De Almeida, Delicato E, Name A, Simão C, Morimoto HK, Kallaur AP, Flauzino T. AIDS & Clinical PvuII Genetic Polymorphism of Low Density Lipoprotein Receptor in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients : Possible Association with Dyslipidemia. *AIDS Clin Res* 2014; 5:1–8.
- [22]. 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.
- [23]. Salazar L a, Hirata MH, Forti N, Diament J, Giannini SD, Issa JS, et al. Pvu II intron 15 polymorphism at the LDL receptor gene is associated with differences in serum lipid concentrations in subjects with low and high risk for coronary artery disease from Brazil. *Clin Chim Acta* 2000; 293:75–88.
- [24]. 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.
- [25]. Gonzales-Flecha, B.G.; 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.

- [26]. 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.
- [27]. Del Valle J, Mira JA, de los Santos I, López-Cortés LF, Merino D, Rivero A, et al. Baseline serum low-density lipoprotein cholesterol levels predict response to hepatitis C virus therapy in HIV/hepatitis C virus coinfecting patients. *AIDS* 2008; 22:923–30.
- [28]. Harrison SA, Rossaro L, Hu K-Q, Patel K, Tillmann H, Dhaliwal S, et al. Serum cholesterol and statin use predict virological response to peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatology* 2010; 52:864–74.
- [29]. Chen JY, Wang JH, Lin CY, Chen PF, Tseng PL, Chen CH, et al. Lower prevalence of hypercholesterolemia and hyperglyceridemia found in subjects with seropositivity for both Hepatitis B and C strains independently. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25:1763-8.
- [30]. Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Chre Y, Koike K, Vona G, et al. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion : a model of viral-related steatosis. *FASEB J* 2002;16:185–94.
- [31]. 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.
- [32]. Fujita N, Sugimoto R, Takeo M, Urawa N, Mifuji R, Tanaka H. Hcpidin expression in the liver : relatively low level in patients with chronic hepatitis C. *Mol Med* 2007;13:97–104.

- [33]. Halliwell B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. *Encycl LIFE Sci*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd 2005; pp 1–7.
- [34]. Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJ. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:709–18.
- [35]. Selmeçi L, Székely M, Soós P, Seres L, Klinga N, Geiger A, et al. Human blood plasma advanced oxidation protein products (AOPP) correlates with fibrinogen levels. *Free Radic Res* 2006;40:952–8.
- [36]. Zuwała-Jagiello J, Warwas M, Pazgan-Simon M. Ischemia-modified albumin (IMA) is increased in patients with chronic hepatitis C infection and related to markers of oxidative stress and inflammation. *Acta Biochim Pol* 2012;59:661–7.
- [37]. Humphries S, Coviello DA, Masturzo P, Balestreri R, Orecchini G, Bertolini S. Variation in the low density lipoprotein receptor gene is associated with differences in plasma low density lipoprotein cholesterol levels in young and old normal individuals from Italy. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:509-16.
- [38]. Berkman N, Weir BS, Pressman-schwartz S, Reshef A, Leitersdorf E. Haplotype analysis at the low density lipoprotein receptor locus : application to the study of familial hypercholesterolemia in Israel. *Hum Genet* 1992;100:405–410.
- [39]. 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.
- [40]. Waterworth DM, Ricketts SL, Song K, Chen L, Zhao JH, Ripatti S, et al. Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:2264–2276.

Figure 1 – Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of the *PvuII* LDLR (intron 15) polymorphism. The genotypes were detected using electrophoresis on 3% agarose gel (70V, 70 min) after staining with ethidium bromide. Ladder: molecular marker with 100 base-pairs. After restriction *PvuII* enzyme digestion, P1P2 genotypes is identified with three fragments after digestion (800 bp, 600 bp and 200 bp); P2P2 genotype is identified with two fragments (200 bp and 600 bp), and P1P1 genotype is identified with one fragment (800 bp).

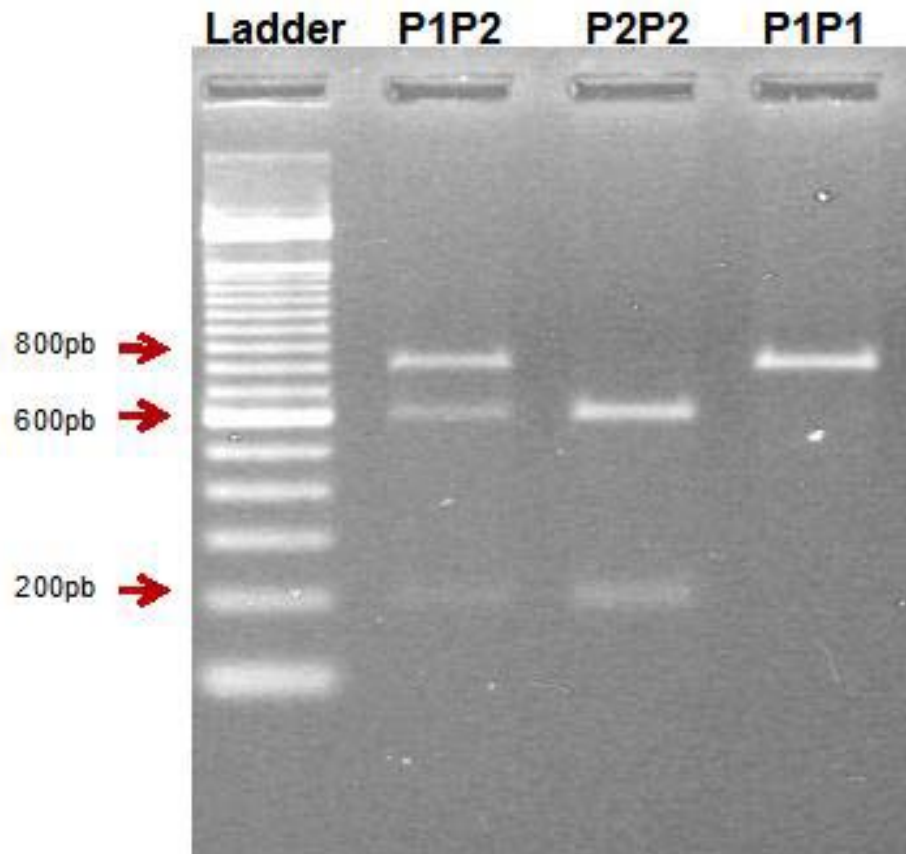


Table I – Demographic, clinical, and laboratory characteristics of patients chronically infected with the hepatitis C virus (CHC) and healthy controls

Parameters	Controls (n = 87)	CHC (n = 46)	p value
Sex n (%)			
Female	65 (74.7)	27 (58.7)	0.1227
Male	22 (25.3)	19 (41.3)	
Ethnicity n (%)			
Caucasian	55 (63.2)	22 (47.8)	0.1271
No Caucasian	32 (36.8)	24 (52.2)	
Age (years)	51.0 (43.0-69.0)	54.0 (46.3-60.0)	0.9262
BMI (kg/m ²)	25.8 (23.6-27.9)	26.6 (23.7-28.9)	0.3205
WC (cm)	93.0 (87.0-95.0)	95.0 (86.0-100.0)	0.5278
AST (U/L)	19.0 (16.0-25.0)	53.5 (41.0-93.4)	<0.0001
ALT (U/L)	35.0 (31.0-42.3)	87.5 (60.8-130.5)	<0.0001
γGT (U/L)	25.0 (21.0-36.0)	76.0 (38.5-145.5)	<0.0001
Iron (μg/dL)	106.0 (83.0-125.0)	132.0 (98.5-178.0)	0.0019
Ferritin (μg/L)	72.1 (35.5-139.1)	262.9 (95.2-490.3)	<0.0001
Triglycerides (mg/dL)	111.0 (71.0-153.0)	88.0 (59.8-122.0)	0.0395
TC (mg/dL)	203.0 (174.0-229.0)	158.5 (136.5-185.0)	<0.0001
HDL-C (mg/dL)	60.0 (49.0-68.0)	52.0 (43.0-65.0)	0.0388
LDL-C (mg/dL)	115.6 (96.8-144.2)	86.6 (57.9-107.8)	<0.0001
APRI	—	0.67 (0.36-2.40)	—

CHC, chronic hepatitis C; BMI, body mass index; WC, waist circumference; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; γGT, gamma-glutamyltransferase; TC: total cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; APRI: aminotransferase-to-platelet ratio index. Categorical variables were analysed using chi-squared test or Fisher Exact test; continuous variables were expressed as median and interquartile range (25%-75%) and were analysed using Mann-Whitney test; p < 0.05 was considered significant.

Table II – Oxidative stress evaluated in patients chronically infected with the hepatitis C virus and healthy controls

Parameters	Controls (n=87)	CHC (n=46)	p value
AOPP (μ moles/L of chloramine-T equivalents)	150.4 (118.4-209.6)	132.1 (102.9-180.4)	0.3364
Hydroperoxides (RLU)	166.7 (141.9-179.0)	183.2 (167.2-225.5)	0.0067
TRAP (mM Trolox/ UA mg/mL)	158.6 (123.3-199.7)	137.3 (119.8-154.7)	0.0302
Oxidative Stress Index	0.233 (0.168-0.327)	1.210 (0.684-1.536)	< 0.0001

CHC, chronic hepatitis C; AOPP, advanced oxidation protein products; RLU: relative light unit; TRAP, Total Radical Trapping Antioxidant Parameter; UA: uric acid; Oxidative Stress Index, AOPP / TRAP ratio; continuous variables were expressed as median and interquartile range (25%-75%) and were analysed using Mann-Whitney test; $p < 0.05$ was considered significant.

Table III – Clinical and laboratory characteristics of patients infected with hepatitis C virus according to the *PvuII* in intron 15 polymorphism of the *low-density lipoprotein receptor (LDLR)* gene

Parameters	<i>PvuII</i> LDLR genotype		p value
	P1P1 (n=27)	P1P2+P2P2 (n=19)	
Sex n (%)			
Female / Male	16 (59.3)/ 11 (40.7)	11 (57.9)/8 (42.1)	0.8325
Age (years)	54.0 (46.5-61.0)	55.0 (47.0-60.0)	0.9433
Ethnicity n (%)			
Caucasian	11 (40.7)	10 (52.6)	0.6195
No Caucasian	16 (59.3)	9 (47.4)	
HCV genotype			
1	25 (92.6)	18 (94.7)	0.7517
3	2 (7.4)	1 (5.3)	
Disease duration (years)	4.0 (3.0-10.7)	3.0 (1.0-9.3)	0.1302
BMI (kg/m ²)	26.5 (24.1-27.9)	26.4 (23.6-29.5)	0.9509
WC (cm)	96.0 (86.0-100.0)	93.0 (88.3-104.3)	0.8243
AST (U/L)	50.0 (32.0-77.0)	70.0 (48.0-112.3)	0.0438
ALT (U/L)	71.5 (42.5-109.3)	115.0 (77.0-129.5)	0.0271
γGT (U/L)	66.0 (39.0-110.0)	87.0 (36.3-180.5)	0.4514
Iron (μg/dL)	134.0 (104.0-179.0)	125.5 (93.3-174.8)	0.6184
Ferritin (μg/L)	259.8 (113.0-493.4)	272.9 (85.7-440.1)	0.6127
APRI	0.509 (0.272-1.106)	1.311 (0.726-3.621)	0.0265
HCV Ag Core (fmol/L)	5067 (2738-15070)	1496 (796-4425)	0.0235

CHC, chronic hepatitis C; BMI, body mass index; WC, waist circumference; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; γGT, gamma-glutamyltransferase; TC: total cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; APRI, aminotransferase-to-platelet ratio index; HCV Ag core: core antigen of hepatitis C virus. Categorical variables were expressed as number (n) and percentage (%) and were analysed using chi-squared test or Fisher Exact test, when appropriate; continuous variables were expressed as median and interquartile range (25%-75%) and were analysed using Mann-Whitney test; p < 0.05 was considered significant.

Table IV – Oxidative stress markers obtained from the patients chronically infected with hepatitis C virus, according to the *PvuII* in intron 15 polymorphism of the *low-density lipoprotein receptor (LDLR)* gene

Parameters	<i>PvuII</i> LDLR genotype		p value
	P1P1 (n=27)	P1P2+P2P2 (n=19)	
AOPP	132.4 (109.7-244.5)	117.3 (97.5-170.0)	0.2115
Hydroperoxides	176.8 (160.6-202.9)	193.2 (174.4-243.2)	0.0398
TRAP/UA	132.8 (113.0-154.7)	137.8 (130.3-158.2)	0.5934
OSI	0.266 (0.233-0.342)	0.308-0.250-0.357)	0.2470

AOPP: advanced oxidation protein products, expressed as $\mu\text{moles/L}$ of chloramine-T equivalents; Hydroperoxydes: expressed as relative light unit (RLU); TRAP: Total Radical Trapping Antioxidant Parameter expressed as mM Trolox; UA: uric acid, expressed as mg/dL; OSI: Oxidative Stress Index expressed as AOPP / TRAP ratio; continuous variables were expressed as median and interquartile range (25%-75%) and were analysed using Mann-Whitney test; $p < 0.05$ was considered significant.

6 CONCLUSÕES

- A frequência dos genótipos P1P1, P1P2 e P2P2 do polimorfismo *PvuII* no intron 15 do *LDLR* foi de 58,7%, 34,8% e 6,5% nos indivíduos infectados pelo HCV e de 54,0%, 43,7% e 2,3% nos indivíduos saudáveis; a frequência dos alelos P1 e P2 entre os pacientes com HCC foi de 0,7608 e 0,2391, respectivamente, e entre os controles foi de 0,7586 e 0,2413, respectivamente, não apresentando diferença significativa;
- Os pacientes infectados cronicamente pelo HCV apresentaram níveis séricos diminuídos de CT, TG, LDL-C e HDL-C comparados aos controles;
- Os pacientes infectados cronicamente pelo HCV apresentaram alteração dos marcadores de lesão hepática como AST, ALT, γ GT e APRI, assim como de estresse oxidativo com aumento dos hidroperóxidos, índice OSI e diminuição da relação TRAP/ácido úrico comparados com os indivíduos saudáveis;
- O alelo P2 do polimorfismo *PvuII* do intron 15 do *LDLR* foi associado com os marcadores de lesão hepática, de estresse oxidativo e de antígeno de core do HCV em indivíduos infectados pelo HCV;
- Os níveis de antígeno de core do HCV foram independentemente associados com o polimorfismo *PvuII* do *LDLR* avaliado neste estudo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo forneceu, pela primeira vez, dados da associação entre o polimorfismo *PvuII* localizado no intron 15 do *LDLR* e alterações nos níveis dos marcadores de estresse oxidativo, HCV Ag core, enzimas hepáticas e grau de fibrose nos pacientes brasileiros infectados pelo HCV, demonstrando que o alelo P2 está relacionado com níveis elevados dos marcadores de lesão hepática.

Algumas limitações devem ser consideradas como o número limitado de pacientes cronicamente infectados pelo HCV avaliados no estudo assim como a não realização de biópsia hepática para a avaliação do grau de fibrose nos mesmos. No entanto, a utilização do APRI substituiu, parcialmente, o procedimento invasivo e viabilizou o estudo da associação dos genótipos com o grau estimado de fibrose. Outra limitação seria a avaliação do efeito desta variante alélica, isoladamente. Outros polimorfismos genéticos associados à dislipidemia e ao estresse oxidativo merecem ser investigados em pacientes infectados cronicamente pelo HCV como uma contribuição para a identificação de indivíduos com genótipos associados ao desenvolvimento destas alterações e que podem levar a uma pior evolução da doença.

Os resultados reforçam os efeitos do HCV nos níveis de lipídeos séricos dos pacientes infectados cronicamente levando a um perfil hipolipêmico; além disto, os resultados sugerem que o alelo P2 estaria associado à maior expressão do *LDLR* com possível efeito limitante na carga viral circulante e deletério no estresse oxidativo e lesão hepática. Portanto, essa variante genética poderia ser um candidato a marcador de identificação de indivíduos com maior chance de desenvolver níveis mais elevados de estresse oxidativo e lesão hepática e que poderiam se beneficiar com terapias específicas para estes efeitos associados ao HCV. Para uma melhor estimativa do real significado destas correlações, estudos com um maior número de indivíduos devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AGNELLO, V. et al. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 22, p. 12766–71, 26 out. 1999.
- ANDRÉ, P. et al. Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 76, p. 6919–6928, 2002.
- BARTOSCH, B.; DUBUISSON, J. Recent advances in hepatitis C virus cell entry. **Viruses**, v. 2, n. 3, p. 692–709, mar. 2010.
- BERTOLINI, S. et al. RFLPs of the LDL-receptor gene: Their use in the diagnosis of FH and in evaluation of different levels of gene expression on normal subjects. **European Journal of Epidemiology**, v. 8, n. 2, p. 18–25, 1992.
- BOSTAN, N.; MAHMOOD, T. An overview about hepatitis C: a devastating virus. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 91–133, maio 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde (2004). Agência Nacional de Vigilância Sanitária . Resolução RDC n. 153, 14 de Junho de 2004. Diário Oficial 24 de junho de 2004. Brasil.
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 232, n. 4, p. 34–47, 1986.
- BURLONE, M. E.; BUDKOWSKA, A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. **The Journal of General Virology**, v. 90, n. Pt 5, p. 1055–70, maio 2009.
- CARMEN FIERBINȚEANU-BRATICEVICI, M. M.; LAURA TRIBUS, ANA PETRIȘOR, S. M. C.; D. CREȚOIU, R. USVAT, L. I. Hepatocyte steatosis in patients infected with genotype 1 hepatitis C virus. **Romenian Journal of Morphology and Embriology**, v. 51, n. 2, p. 235–242, 2010.
- CDC. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 47, n. Cdc, p. 1–39, 1998.
- CHEN, J. Y. et al. Lower prevalence of hypercholesterolemia and hyperglyceridemia found in subjects with seropositivity for both Hepatitis B and C strains independently. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 25, n. 11, p. 1763–1768, nov. 2010.

CICHOŹ-LACH, H.; MICHALAK, A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 25, p. 8082–91, 7 jul. 2014.

DE ALMEIDA, DELICATO, E. et al. AIDS & Clinical PvuII Genetic Polymorphism of Low Density Lipoprotein Receptor in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients : Possible Association with Dyslipidemia. **AIDS & Clinical Research**, v. 5, n. 11, p. 1–8, 2014.

DEL VALLE, J. et al. Baseline serum low-density lipoprotein cholesterol levels predict response to hepatitis C virus therapy in HIV/hepatitis C virus coinfecting patients. **AIDS**, v. 22, n. February, p. 923–930, 2008.

DIEDRICH, G. How does hepatitis C virus enter cells? **FEBS Journal**, v. 273, n. 17, p. 3871–3885, set. 2006.

EGGER, D. et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. **Journal of Virology**, v. 76, n. 12, p. 5974–5984, 2002.

F. JAVIER CHAVES, O. P. et al. Seven DNA polymorphisms. **Clinical Genetics**, v. 50, p. 28–35, 1996.

FRIKKE-SCHMIDT, R. et al. Single nucleotide polymorphism in the low-density lipoprotein receptor is associated with a threefold risk of stroke. A case-control and prospective study. **European Heart Journal**, v. 25, n. 11, p. 943–51, jun. 2004.

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.

GONZALES-FLECHA, B.G.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 10, p. 93–100, 1991.

GOSERT, R. et al. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. **Journal of virology**, v. 77, n. 9, p. 5487–5492, 2003.

GUDNASON, V. et al. Detection of the low density lipoprotein receptor gene PvuII intron 15 polymorphism using the polymerase chain reaction: association with plasma lipid traits in healthy men and women. **Disease Markers**, v. 13, p. 209–220, 1998.

HALLIWELL, B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–7, 30 maio 2005.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257–265, 2012.

HARRISON, S. A et al. Serum cholesterol and statin use predict virological response to peginterferon and ribavirin therapy. **Hepatology**, v. 52, n. 3, p. 864–74, set. 2010.

- HENNIG, B. J. W. et al. Association of low-density lipoprotein receptor polymorphisms and outcome of hepatitis C infection. **Genes and Immunity**, v. 3, n. 6, p. 359–67, set. 2002.
- HOOFNAGLE, J. H. Course and outcome of hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S21–9, nov. 2002.
- HUMPHRIES S et al. Variation in the low density lipoprotein receptor gene is associated with differences in plasma low density lipoprotein cholesterol levels in young and old normal individuals from Italy. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v. 11, p. 509–16, 1991
- IKEDA, M. et al. Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. **Hepatology**, v. 44, n. 1, p. 117–25, jul. 2006.
- JAIN, S. K. et al. Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease. **Journal of Hepatology**, v. 36, p. 805–811, 2002.
- KAPADIA, S. B.; CHISARI, F. V. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 2561–2566, 2005.
- 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.
- LAUER, G. M, WALKER, B. D. Hepatitis C virus infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 1, 2001.
- LEIGH, S. E. A et al. Update and analysis of the university college London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database. **Annals of Human Genetics**, v. 72, p. 485–498, 2008.
- LEITERSDORF, E.; CHAKRAVARTI, A; HOBBS, H. H. Polymorphic DNA haplotypes at the LDL receptor locus. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 409–421, 1989.
- LI, W. H.; SADLER, L. A. Low nucleotide diversity in man. **Genetics**, v. 129, p. 513–523, 1991.
- LIANG, T. J.; GHANY, M. G. Current and future therapies for hepatitis C virus infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 20, p. 1907–17, 16 maio 2013.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 933–8, 18 ago. 2005.
- MARCELLIN, P.; ASSELAH, T.; BOYER, N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S47–56, nov. 2002.
- MAS MARQUES, A. et al. Low-density lipoprotein receptor variants are associated with spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 5, p. 847–52, set. 2009.

MILLER, R. D.; KWOK, P. Y. The birth and death of human single-nucleotide polymorphisms: new experimental evidence and implications for human history and medicine. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 20, p. 2195–8, 1 out. 2001.

MIYANARI, Y. et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 9, p. 1089–97, set. 2007.

MOHD HANAFIAH, K. et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 1333–42, abr. 2013.

MOLINA, S. et al. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. **Journal of Hepatology**, v. 46, n. 3, p. 411–419, mar. 2007.

MONAZAHIAN, M. et al. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. **Journal of Medical Virology**, v. 57, n. August 1998, p. 223–229, 1999.

NEGRO, F.; SANYAL, A. J. Hepatitis C virus, steatosis and lipid abnormalities: clinical and pathogenic data. **Liver international**, v. 29 Suppl 2, p. 26–37, mar. 2009.

NEMETH, E.; GANZ, T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. **Annual Review of Nutrition**, v. 26, p. 323–42, jan. 2006.

OPAS. Organização Panamericana de la Salud, Guías para el Control y Monitoreo de la Epidemia Tabáquica. In: Instituto Nacional de Câncer (INCA). *Abordagem e tratamento do fumante: consenso 2001*. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer (INCA); 2001.

OSINUSI, A. et al. Sofosbuvir and ribavirin for hepatitis C genotype 1 in patients with unfavorable treatment characteristics: a randomized clinical trial. **JAMA**, v. 310, n. 8, p. 804–11, 28 ago. 2013.

PERLEMUTER, G. et al. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion : a model of viral-related steatosis. **FASEB Journal**, v. 16, p. 185–194, 2002.

PETIT, J. Hepatitis C virus–associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 98, n. 5, p. 1150–1154, maio 2003.

PETIT J-M, et al. Cell surface expression of LDL receptor in chronic hepatitis C: correlation with viral load. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 293, p. E416-20, 2007.

PINEDA, J. A et al. Low-density lipoprotein receptor genotyping enhances the predictive value of IL28B genotype in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. **AIDS**, v. 25, n. 11, p. 1415–20, 17 jul. 2011.

REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 255, n. 2, p. 107–117, nov. 1996.

RIVERO-JUAREZ, A. et al. LDLr genotype modifies the impact of IL28B on HCV viral kinetics after the first weeks of treatment with PEG-IFN/RBV in HIV/HCV patients. **AIDS (London, England)**, v. 26, n. 8, p. 1009–15, 15 maio 2012.

SALAZAR, L. A et al. Pvu II intron 15 polymorphism at the LDL receptor gene is associated with differences in serum lipid concentrations in subjects with low and high risk for coronary artery disease from Brazil. **Clinica Chimica Acta**, v. 293, n. 1-2, p. 75–88, mar. 2000a.

SALAZAR, L. A et al. Molecular basis of familial hypercholesterolemia in Brazil: Identification of seven novel LDLR gene mutations. **Human Mutation**, v. 19, n. 4, p. 462–3, abr. 2002.

SALAZAR, L. A. et al. Polymorphisms of the low-density lipoprotein receptor gene in Brazilian individuals with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1301–4, 2000b.

SASS, C. et al. Evidence for a cholesterol-lowering gene in a French-Canadian kindred with familial hypercholesterolemia. **Human Genetics**, v. 96, p. 21–26, 1995.

SEIPP, S. et al. Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro. **Journal of Genetics Virology**, v. 78 (Pt 10, p. 2467–2476, 1997.

SERFATY, L. et al. Hepatitis C virus induced hypobetalipoproteinemia: a possible mechanism for steatosis in chronic hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v. 34, p. 428–434, 2001.

SHARAFI, H.; ALAVIAN, S. M. IL28B polymorphism, Explanation for Different Responses to Therapy in Hepatitis C Patients. **Hepatitis Monthly**, v. 11, n. 12, p. 958–9, dez. 2011.

SHEPARD, C. W.; FINELLI, L.; ALTER, M. J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **The Lancet Infectious diseases**, v. 5, n. 9, p. 558–67, set. 2005.

SIAGRIS, D. et al. Serum lipid pattern in chronic hepatitis C: Histological and virological correlations. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 13, p. 56–61, 2006.

STEINMANN, E.; PIETSCHMANN, T. Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. **Viruses**, v. 2, n. 9, p. 2078–95, set. 2010.

SÜDHOF, T. C. et al. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. **Science**, v. 228, n. January, p. 815–822, 1985.

SUNYAEV, S.; RAMENSKY, V.; BORK, P. Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 5, p. 198–200, maio 2000.

- SUPPIAH, V. et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. **Nature Genetics**, v. 41, n. 10, p. 1100–4, out. 2009.
- TAKEO, M. et al. Upregulation of transferrin receptor 2 and ferroportin 1 mRNA in the liver of patients with chronic hepatitis C. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 20, n. May 2004, p. 562–569, 2005.
- TANAKA, Y. et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **Nature Genetics**, v. 41, n. 10, p. 1105–9, out. 2009.
- TAWESAK TANWANDEE MD, M. P. M. et al. Genetic Polymorphism of Low-Density Lipoprotein Receptor Did Not Affect Treatment Outcome of Chronic Hepatitis C Genotype 3. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 94, p. 147–153, 2011.
- THOMSEN, R.; BONK, S.; THIELE, A. Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 182, p. 329–334, 1993.
- USIFO, E. et al. Low-Density Lipoprotein Receptor Gene Familial Hypercholesterolemia Variant Database: Update and Pathological Assessment. **Annals of Human Genetics**, v. 76, p. 387–401, 2012.
- VENTURINI, D. et al. Increased oxidative stress, decreased total antioxidant capacity, and iron overload in untreated patients with chronic hepatitis C. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 55, n. 4, p. 1120–7, abr. 2010.
- VILLÉGER, L. et al. The UMD-LDLR database: Additions to the software and 490 new entries to the database. **Human Mutation**, v. 20, p. 81–87, 2002.
- WAI, C.-T. et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 38, n. 2, p. 518–26, ago. 2003.
- WANG, C. et al. Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. **Molecular Cell**, v. 18, n. 4, p. 425–34, 13 maio 2005.
- WANG, D. G. et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science**, v. 280, n. 5366, p. 1077–82, 15 maio 1998.
- WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney International**, v. 49, p. 1304–1313, 1996.
- World Health Organization – WHO. Global status report on alcohol. Geneva: WHO, 2004.

WÜNSCHMANN, S. et al. Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. **Journal of Virology**, v. 74, n. 21, p. 10055–62, nov. 2000.

YANIK, M.; EREL, O.; KATI, M. The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 16, n. 4, p. 200–203, ago. 2004.

YE, J. et al. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 26, p. 15865–70, 23 dez. 2003.



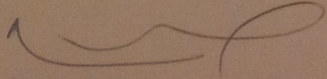
YE, J. Reliance of host cholesterol metabolic pathways for the life cycle of hepatitis C virus. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 8, p. 1017–1022, 31 ago. 2007.

ZEIN, N. N. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 223–235, 1 abr. 2000.

ZEREMSKI M, et al. The role of chemokines as inflammatory mediator in chronic hepatitis C virus infection . **Journal of Viral Hepatitis**, v.14, p. 675-687, 2007.

ANEXOS

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:**

“ENVOLVIMENTO DO POLIMORFISMO *PvuII* NO INTRON 15 DO GENE RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE NO ESTRESSE OXIDATIVO, PERFIL LIPÍDICO E LESÃO HEPÁTICA EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa “ENVOLVIMENTO DO POLIMORFISMO *PvuII* NO INTRON 15 DO GENE RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE NO ESTRESSE OXIDATIVO, PERFIL LIPÍDICO E LESÃO HEPÁTICA EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA”, realizada na **“Universidade Estadual de Londrina”**. O objetivo da pesquisa é determinar a associação entre o polimorfismo genético *PvuII* do intron 15 do LDLR e as alterações metabólicas, níveis de marcadores de estresse oxidativo e plasmáticos de antígeno (Ag) core do HCV 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 (Lucas Silva Liberatti, Av. Robert Koch, n.60, emailucas_al15@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:9959494-2

Lucas Silva Liberatti

_____ (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.