



**unesp**

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia  
Aplicadas à Farmácia**

**CAMILA TITA NOGUEIRA**

**Estudo da influência dos genótipos 1 e 3 do vírus da hepatite C sobre  
os indicadores do metabolismo lipídico em hepatopatas crônicos**

**Orientador: Prof. Dr. PAULO INÁCIO DA COSTA**

**Araraquara – SP  
2009**

## **CAMILA TITA NOGUEIRA**

### **Estudo da influência dos genótipos 1 e 3 do vírus da hepatite C sobre os indicadores do metabolismo lipídico em hepatopatas crônicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa**

**Araraquara - SP**

**2009**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

N778e Nogueira, Camila Tita  
Estudos da influência dos genótipos 1 e 3 do vírus da hepatite C sobre os indicadores do metabolismo lipídico em hepatopatas crônicos. / Camila Tita Nogueira. – Araraquara, 2009.  
66 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia  
Orientador: Paulo Inácio da Costa

1. Colesterol. 2. Vírus da hepatite C. 3. Viremia. 4. Genótipos do VHC. I. Costa, Paulo Inácio da, orient. II. Título.

***"Quando o homem aprender a respeitar até o  
menor ser da criação, seja animal ou vegetal,  
ninguém precisará ensiná-lo a amar seu  
semelhante."  
(Albert Schweitzer)***

## **DEDICATÓRIA**

*Essa dissertação é dedicada ao meu marido, amigo e companheiro, Rodrigo de Marchi, por me mostrar que o caminho da perseverança e do trabalho duro pode ser o mais difícil, mas que também é o mais gratificante, aos meus pais, José Carlos e Leila, por me ensinarem que a honestidade e a dedicação devem estar presentes em tudo aquilo que realizamos, e às minhas irmãs, Carina e Catiana, por todo o apoio nessa longa jornada da minha formação como profissional e como pessoa.*

## **AGRADECIMENTOS**

Meus mais sinceros agradecimentos:

Ao professor Dr. Paulo Inácio da Costa, que orientou o desenvolvimento desse trabalho, por me oferecer essa importante oportunidade de crescimento profissional;

À minha grande amiga, Ana Carolina, por sua imensa ajuda nos momentos mais difíceis e por nunca me deixar desanimar frente aos problemas;

Às minhas grandes amigas Michelle, Camila, Gesibel e Eleine, por enxugarem minhas lágrimas nos momentos de aflição e por nunca deixarem que eu perdesse a fé e a autoconfiança;

Ao técnico do laboratório de virologia, Milton, por ser tão prestativo ao me fornecer parte das amostras biológicas utilizadas nesse trabalho;

A toda equipe do Hemonúcleo Regional de Araraquara, por me fornecerem as amostras biológicas utilizadas como controles nesse trabalho;

Ao Dr. Honain e às enfermeiras Silvana, Maria José, Denise e Ana, do Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA), por me acolherem com tanto carinho e por me oferecerem informações que foram de enorme importância para a concretização desse trabalho;

À Profa. Juliana Oliveira, por me auxiliar com as análises estatísticas desse trabalho em um momento de grande necessidade;

À professora Dra. Márcia Graminha, alguém muito especial que apareceu em meu caminho e me ofereceu sua amizade e também grande ajuda;

Aos professores participantes da banca de qualificação, Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti e Dr. Cleslei Fernando Zanelli, por gentilmente contribuírem para o aprimoramento desse trabalho;

Aos funcionários do NAC, pelo auxílio no processamento das amostras biológicas;

Às funcionárias da pós-graduação, Cláudia, Sônia e Laura, pela ajuda e paciência;

Aos voluntários que participaram desse estudo, sem os quais não teria sido possível realizá-lo.

# SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>10</b>
<b>Lista de Tabelas .....</b>	<b>12</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Símbolos .....</b>	<b>13</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>15</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>16</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>17</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>28</b>
<b>3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>29</b>
3.1. Teste Qualitativo Comercial para Detecção do RNA-VHC .....	30
3.2. Preparo das Amostras .....	31
3.3. Transcrição Reversa e Amplificação do RNA Alvo .....	31
3.3.1. Seleção do Alvo .....	31
3.3.2. Transcrição Reversa .....	31
3.3.3. Amplificação do Alvo .....	32
3.3.4. Reação de Hibridização .....	32
3.3.5. Reação de Detecção .....	33
3.3.6. Interpretação dos Resultados .....	33
3.3.7. Reação Quantitativa para RNA-VHC.....	34
3.4. Genotipagem do VHC .....	34
3.5. Dosagem de Lipoproteínas Séricas .....	35
3.6. Dosagem da Apolipoproteína B .....	37



3.6.1. Imunoturbidimetria .....	37
3.7. Análise Estatística dos Resultados .....	39
<b>4. Resultados .....</b>	<b>40</b>
<b>5. Discussão .....</b>	<b>50</b>
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>55</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>56</b>
<b>8. Anexos .....</b>	<b>64</b>
Termo de doação de material biológico .....	65
Termo de consentimento livre e esclarecido .....	66

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática da genotipagem pelo processo de hibridização reversa, identificando os 6 genótipos principais e subtipos.....	<b>20</b>
<b>Figura 2</b>	Perfil lipídico de homens portadores do VHC .....	<b>41</b>
<b>Figura 3</b>	Perfil lipídico de mulheres portadoras do VHC .....	<b>41</b>
<b>Figura 4</b>	Perfil lipídico de homens portadores do VHC genótipo 1a .....	<b>42</b>
<b>Figura 5</b>	Perfil lipídico de mulheres portadoras do VHC genótipo 1a.....	<b>42</b>
<b>Figura 6</b>	Perfil lipídico de homens portadores do VHC genótipo 1b.....	<b>43</b>
<b>Figura 7</b>	Perfil lipídico de mulheres portadoras do VHC genótipo 1b .....	<b>43</b>
<b>Figura 8</b>	Perfil lipídico de homens portadores do VHC genótipo 1a/1b ....	<b>44</b>
<b>Figura 9</b>	Perfil lipídico de homens portadores do VHC genótipo 3a .....	<b>45</b>
<b>Figura 10</b>	Perfil lipídico de mulheres portadoras do VHC genótipo 3a .....	<b>45</b>
<b>Figura 11</b>	Apolipoproteína B de homens portadores do VHC .....	<b>46</b>
<b>Figura 12</b>	Apolipoproteína B de mulheres portadoras do VHC .....	<b>46</b>
<b>Figura 13</b>	Correlação entre carga viral e HDL de pacientes portadores do VHC genótipo 1a .....	<b>48</b>
<b>Figura 14</b>	Correlação entre carga viral e HDL de pacientes portadores do VHC genótipo 1b .....	<b>48</b>
<b>Figura 15</b>	Correlação entre carga viral e Apo B de pacientes portadores do VHC genótipo 1 .....	<b>48</b>

<b>Figura 16</b>	Correlação entre carga viral e LDL de pacientes portadores do VHC genótipo 1 .....	<b>48</b>
<b>Figura 17</b>	Correlação entre carga viral e Apo B de pacientes portadores do VHC genótipo 1a.....	<b>49</b>
<b>Figura 18</b>	Correlação entre carga viral e LDL de pacientes portadores do VHC genótipo 1a.....	<b>49</b>
<b>Figura 19</b>	Correlação entre carga viral e Apo B de pacientes portadores do VHC genótipo 1b .....	<b>49</b>
<b>Figura 20</b>	Correlação entre carga viral e LDL de pacientes portadores do VHC genótipo 1b .....	<b>49</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	Classes de Lipoproteínas .....	<b>24</b>
<b>Tabela 2</b>	Distribuição entre sexo e faixa etária .....	<b>35</b>
<b>Tabela 3</b>	Perfil lipídico - valores de referência em adultos .....	<b>35</b>
<b>Tabela 4</b>	Distribuição entre sexo e genótipo .....	<b>40</b>
<b>Tabela 5</b>	Alterações encontradas nas classes de lipoproteínas e apo B de acordo com sexo dos pacientes e genótipos do VHC.	<b>50</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Apo B	Apolipoproteína B
cDNA	DNA complementar
DAC	Doenças cardiovasculares
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Desoxinucleosídeos trifosfatos
HDL	High density lipoprotein (Lipoproteína de alta densidade)
IDL	Intermediary density lipoprotein (Lipoproteína de densidade intermediária)
INF	Interferon
IRES	Internal ribosome entry site
LDL	Low density lipoprotein (Lipoproteína de baixa densidade)
LDLr	Receptor celular da lipoproteína de baixa densidade
mg/dL	Miligramas por decilitro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Open reading frame
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucléico

rTth pol	Polimerase de <i>Thermus thermophilus</i>
RVS	Resposta viral sustentada
SR-BI	Receptor scavenger tipo B classe I
TMB	Tetrametilbenzidina
TRIG	Triglicérides
UI/mL	Unidades internacionais por mililitro
UTR	Untranslated regions
VHC	Vírus da Hepatite C
VLDL	Very low density lipoprotein (Lipoproteína de densidade muito baixa)

## RESUMO

---

Os perfis metabólicos correlacionam-se com a infecção pelo VHC e são prognósticos da resposta viral em pacientes crônicos. Porém, pouco se sabe a respeito da associação entre perfis lipídicos e carga viral do VHC entre infecções dos genótipos 1, 2 ou 3. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a influência da viremia e dos genótipos do VHC sobre o metabolismo lipídico através das variações de lipoproteínas séricas (colesterol total, LDL, HDL, VLDL, triglicérides) e apolipoproteína B (Apo B) em hepatopatas crônicos, avaliando se o VHC predispõe os indivíduos ao aparecimento de complicações vasculares. O grupo amostral constituiu-se de um total de 150 pacientes crônicos do VHC com genótipos 1, 2 ou 3, e de um grupo controle de 20 indivíduos saudáveis (10 homens e 10 mulheres) em idade adulta (20 à 50 anos). Os níveis séricos de HDL (28%), VLDL (26%) e triglicérides (26%) nos portadores crônicos do VHC se mostraram diminuídos em relação ao grupo controle, enquanto os níveis de LDL (25%) e Apo B (29%) se mostraram elevados, resultados que foram mais importantes nos portadores do genótipo 3a. Observou-se correlação positiva entre a viremia e alterações nos níveis de apo B ( $r = 0,5763$ ) nos portadores do genótipo 1b. Assim, foi pressuposto que o risco de pacientes portadores do VHC desenvolverem complicações vasculares é elevado, pois 1% de redução nos níveis de LDL está associado com uma redução de 2-3% no risco de desenvolvimento de doenças cardíacas, e como cerca de 90% da proteína na LDL se constitui de apo B, sua concentração plasmática indica o número total de partículas potencialmente aterogênicas. Desta forma, o perfil lipídico auxilia no diagnóstico da severidade da infecção hepática causada pelo VHC e ainda atua como um bom sinal prognóstico.

**Palavras-chave:** colesterol, vírus da hepatite C, viremia, genótipos do VHC.

## **ABSTRACT**

---

The metabolic profiles correlate with the hepatitis C virus infection and are prognostics for the viral reply in chronic patients. However, little is known regarding the distinguishing association between lipid profiles and hepatitis C viral load in patients carrying genotypes 1, 2 or 3. Therefore, the objective of this work was to study viremia and genotypes on the lipid metabolism through the serum lipoprotein variations (total cholesterol, LDL, HDL, VLDL, triglycerides) and apolipoprotein B (Apo B) in chronic carriers of this infection, evaluating if the HCV premakes the individual to the lipidic disequilibrium and favors the appearance of vascular complications. The amostral group consisted of 150 HCV chronic patients with genotypes 1, 2 or 3, and a control group consisted of 20 healthful individuals (10 men and 10 women) in adult age (20 to 50 years). The levels of HDL (28%), VLDL (26%) and triglycerides (26%) of the HCV chronic patients were lower than the control group, while the LDL levels (25%) and the Apo B levels (29%) were higher. These findings were more significant in the genotype 3a carrying patients. Positive correlation occurred between the viremia and the alterations in the Apo B levels ( $r = 0.5763$ ) in the genotype 1b carrying patients. Consequently it was inferred that the risk of HCV patients to develop vascular complication is elevated. In general, 1% of reduction in the LDL levels is associated with a reduction of 2-3% in the risk of development of cardiac illnesses, and, as about 90% of the protein in the LDL is constituted of apo B, its plasmatic concentration indicates the total potentially atherogenics particles number. The lipid profile aids in the diagnosis of the severity of the hepatic infection and equally acts as a good signal prognostic, therefore its analysis must be carried through in all the cases of advanced hepatic infection.

**Keywords:** cholesterol, hepatitis C virus, viremia; HCV genotypes.



## INTRODUÇÃO

---

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é a principal causa de transplante hepático em países desenvolvidos e responsável por 60% das hepatopatias crônicas (WHO, 2003). A persistente infecção pelo VHC, que se desenvolve em 70-80% dos pacientes infectados, freqüentemente progride para a hepatite crônica e é altamente correlacionada com o desenvolvimento da cirrose hepática e do carcinoma hepatocelular (SHIMOTOHNO, 1995; LAI e WARE, 2000). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 3% (entre 170 a 250 milhões de pessoas) da população mundial seja portadora da hepatite C crônica, e aproximadamente 3 a 4 milhões de pessoas tornam-se infectadas a cada ano (SEEFF, 2002).

Após o desenvolvimento de testes de diagnóstico para os vírus da hepatite A e hepatite B nos anos 80, um novo agente transmitido de forma parenteral, responsável pela maioria dos casos de hepatite não-A e hepatite não-B foi reconhecido. A identificação deste agente tornou-se muito difícil e somente com o advento da tecnologia do DNA recombinante foi possível clonar o genoma do vírus que foi denominado vírus da hepatite C (VHC) (CHOO *et al.*, 1989).

O VHC é um vírus envelopado com cerca de 50 a 70 nm de diâmetro, fita positiva de RNA e pertencente ao gênero *Hepacivirus* e à família *Flaviridae*. Seu genoma é constituído por cerca de 9500 nucleotídeos com regiões curtas não codificadoras e hiperconservadas nas extremidades 5' e 3' UTR (*Untranslated Regions*), flanqueando uma única ORF (*Open Reading Frame*) (HOUGHTON *et al.*, 1991). A região 5'UTR, altamente conservada, possui 341 nucleotídeos com uma

estrutura secundária complexa que funciona como *IRES* (*Internal Ribosome Entry Site*), que permite a ligação direta do RNA viral ao ribossomo da célula infectada, possibilitando a tradução das proteínas virais (Di BISCEGLIE, 1999; BARTENSCHLAGER e LOHMANN, 2000; ROSEMBERG, 2001). A 3'UTR é dividida em três regiões: um segmento hipervariável de 40 nucleotídeos, uma cauda poli-U variável em extensão e uma região altamente conservada de 98 nucleotídeos, essencial para replicação *in vivo* (Di BISCEGLIE, 1999; BARTENSCHLAGER e LOHMANN, 2000; ROSEMBERG, 2001). A *ORF* codifica uma poliproteína precursora de aproximadamente 3010 resíduos de aminoácidos que é clivada via mecanismo de sinalização do hospedeiro e proteases virais, em cerca de 10 diferentes proteínas estruturais e não estruturais (ENCKE *et al.*, 1998).

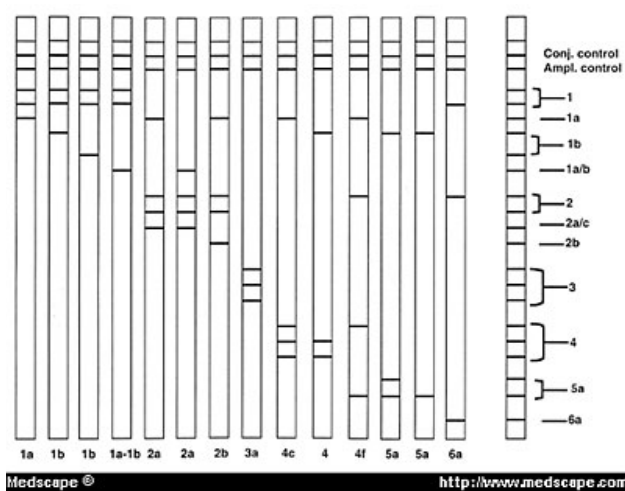
A região estrutural consiste de três genes: o *core* (C) (codifica proteínas do nucleocapsídeo), o E1 e o E2 (que codificam proteínas do envelope) (STADHOUDERS e COOREMAN, 1997). A proteína do *core* é encontrada na superfície do retículo endoplasmático (RE) e possui em sua superfície resíduos de lipídios. Essa proteína apresenta seqüência de aminoácidos altamente conservada entre os diferentes isolados do VHC (KATO *et al.*, 1990; OKAMOTO *et al.*, 1990; CHOO *et al.*, 1991), sendo utilizada como importante alvo antigênico em vários testes diagnósticos comerciais para a detecção de anticorpos anti-VHC. Além disso, parece estar associada a diversas funções, como modulação da transcrição gênica, proliferação, morte e sinalização celular, podendo interferir com metabolismo lipídico e suprir a resposta imune do hospedeiro via mecanismos ainda não conhecidos (McLAUHLAN, 2000; LAI e WARE, 2000; KATO, 2000). Existem evidências de que a interação da proteína do *core* com os resíduos de lipídios presentes no RE pode afetar o

metabolismo dos lipídios, contribuindo para o desenvolvimento da esteatose hepática, que ocorre principalmente nos pacientes infectados com genótipo 3 (WECK, 2005).

As proteínas de envelope E1 e E2 do VHC são altamente glicosiladas, e apresentam funções fundamentais em diferentes etapas do ciclo de replicação do VHC, atuando de forma essencial para entrada, ligação ao receptor e fusão com a membrana da célula hospedeira (BARTENSCHLAGER e LOHMANN, 2000; BARTOSCH *et al.*, 2003).

A região não estrutural consiste de quatro domínios (NS2 – NS5) que codificam proteínas com atividade enzimática, ou seja, as enzimas RNA polimerase RNA-dependente, replicase/helicase, serina protease e metaloprotease (STADHOUDERS e COOREMAN, 1997). A NS2 e o domínio amino-terminal do NS3 constituem a protease NS2-3 que catalisa a clivagem do sítio NS2-NS3 (BARTENSCHLAGER e LOHMANN, 2000). A NS3 é uma molécula bifuncional: possui uma extremidade amino-terminal, uma serina protease e na carboxi-terminal atividades nucleotídeo-trifosfatase (NTPase) e helicase, essenciais para tradução e replicação do VHC (Di BISCEGLIE, 1999; TAYLOR *et al.*, 2000; BARTENSCHLAGER e LOHMANN, 2000). A NS4A é uma proteína que atua como cofator, formando um complexo estável com a NS3, que é requerido para eficiente processamento das proteínas da região NS (LANDRO *et al.*, 1997). A proteína NS4B é altamente hidrofóbica e sua função ainda é desconhecida. A NS5A é altamente fosforilada nos resíduos serina da região central (TANJI *et al.*, 1995), sua função no ciclo viral do VHC ainda não está bem conhecida, porém alguns estudos revelam a associação entre os aminoácidos 2209 a 2248 e a sensibilidade ou resistência ao interferon (IFN), podendo essa região ser utilizada para se estabelecer um prognóstico à terapia (ENOMOTO *et al.*, 1996).

O genoma do VHC exibe significativa variabilidade genética, como resultado de mutações espontâneas que ocorrem durante a replicação viral. Devido a essa variabilidade, um sistema consenso de nomenclatura foi proposto por Simmonds *et al.*, 1994, onde os grupos principais do vírus são designados como genótipos e discriminados com numerais arábicos e os subtipos dentro de um mesmo genótipo, são indicados por letras minúsculas, por ordem de descoberta. Existem pelo menos 6 genótipos e mais de 50 subtipos descritos (LIANG *et al.*, 2000; STUMPF e PYBUS, 2002), como mostra a Figura 1.



**Figura 1:** Representação esquemática da genotipagem pelo processo de hibridização reversa, identificando os 6 genótipos do VHC e seus subtipos.

Embora todos os genótipos possam ser encontrados ao redor do mundo, existe clara distribuição geográfica (BUKH *et al.*, 1995). Os genótipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, e 3a somam mais de 90% das infecções por VHC na América do Norte e do Sul, Europa, Rússia, China, Japão, Austrália e Nova Zelândia. Os genótipos 1a e 1b são responsáveis por 80% (40% cada) dos casos de infecção pelo VHC nos Estados Unidos. O genótipo 1b soma aproximadamente dois terços de isolados de VHC no sul

da Europa, China, Rússia e Japão. O genótipo 4a é o mais predominante no Egito e o genótipo 5a é isolado em 50% de pessoas infectadas pelo VHC na África do Sul. O genótipo 6 é encontrado no Sudeste Asiático (FOURNIER *et al.*, 1998).

Na maior parte das regiões brasileiras, o genótipo 1 é o agente etiológico em 60-75% das infecções pelo VHC. O genótipo 3 é o segundo predominante e o genótipo 2 constitui menos de 5% dos casos (Paraná *et al.*, 2000, Campiotto *et al.*, 2005, Martins *et al.*, 2006). Entre os portadores da infecção pelo VHC, nos municípios da regional de Araraquara, o genótipo 1 e seus subtipos contribui para 65% dos casos, enquanto o genótipo 3a mostra como segundo mais prevalente, representando 34% das infecções. O genótipo 2 e seus subtipos representa apenas 1% das infecções.

O tratamento padrão para os pacientes com infecção crônica é a combinação do INF com ribavirina. Vários critérios são utilizados para o prognóstico da evolução da doença, como carga viral, idade, sexo e extensão da fibrose hepática. Mas, sobre todos esses fatores, o genótipo do VHC é o fator mais importante na predição de resposta ao tratamento antiviral. Cerca de 70 a 80% dos pacientes infectados com genótipo 2 obtêm resposta viral sustentada (RVS). Dependendo da situação histológica do fígado, considerando a presença de fibrose e esteatose, os pacientes infectados com o genótipo 3 podem apresentar RSV em torno de 70%. Já os pacientes infectados com o genótipo 1 obtêm RSV em apenas 40 – 50% dos casos (HOLLAND *et al.*, 1996). Desse modo, a genotipagem do VHC é uma importante ferramenta para o entendimento da evolução e epidemiologia do vírus, além de determinar o prognóstico e o tempo de tratamento.

Um indivíduo infectado com o VHC pode apresentar uma mistura heterogênea de vírus, conhecida pelo termo “quasispécies” e esses diferem somente

por poucos nucleotídeos, e tal fato contribui para o escape imune viral, estabelecendo uma infecção crônica no hospedeiro, e para a resistência viral aos fármacos utilizados no tratamento (BUKH *et al.*, 1995). A existência de quasispécies dificulta o desenvolvimento de vacinas para o VHC e favorece a perpetuação do vírus no organismo. A diversidade genética não é distribuída de maneira regular no genoma viral. As regiões não codificadoras são relativamente conservadas, enquanto as regiões do envelope apresentam alta taxa de mutação (FARCI *et al.*, 2001).

A composição de quasispécies em um indivíduo infectado pode ter grande significado clínico, visto que diversos estudos sugerem que a complexidade de quasispécies pode influenciar a severidade da infecção hepática e a resposta à terapia do INF. Estudos demonstraram uma correlação direta entre a diversidade de quasispécies e a progressão da infecção hepática e sugeriram que o grau de heterogenicidade de quasispécies no início da infecção pelo VHC pode ser usado para prever o resultado do tratamento a longo prazo (HONDA *et al.*, 1996)

As proteínas não-estruturais do VHC e o RNA viral foram detectados no fígado de pacientes contaminados e no de chimpanzés experimentalmente inoculados, confirmando que o fígado é o local da replicação do VHC (BLIGHT e GOWANS, 1995). Porém, as quantidades de proteínas virais e RNA nos tecidos contaminados são muito baixas, necessitando o uso de métodos de detecção altamente sensíveis, contudo igualmente menos confiáveis. Isto pode em parte explicar porque o número relatado de células VHC-positivas detectadas no tecido contaminado do fígado é contraditório e as estimativas variam entre menos de 5% e até 100% (BLIGHT e GOWANS, 1995).

A infecção pelo VHC é caracterizada pela replicação viral nos hepatócitos, mas pode infectar outras células extra-hepáticas, tais como os mononucleares do

sangue periférico e as células biliares. Estas infecções de células não hepáticas poderiam atuar como potenciais reservatórios, contribuindo para seleção de variantes e a persistência viral. A dinâmica da replicação do VHC pode ser deduzida a partir de taxas rápidas de produção do vírus e aparecimento de mutantes. Uma análise cuidadosa da dinâmica viral durante o tratamento antiviral dos pacientes com IFN revelou uma meia-vida do vírion de 3 a 5 horas e uma taxa de clearance e de produção de aproximadamente  $10^{12}$  partículas por dia (ZEUZEM *et al.*, 1998; NEUMANN *et al.*, 1998; RAMRATNAM *et al.*, 1999).

Atualmente, os dados físico-químicos a respeito da partícula viral são inadequados devido aos baixos títulos do vírus no sangue e dificuldade em isolar as partículas virais puras (THOMSON e LIANG, 2000). Isto pode ser devido às diferenças na estrutura virais e a ligação do VHC às lipoproteínas (lipoproteína de baixa densidade [LDL], lipoproteína de muito baixa densidade [VLDL], e lipoproteína de alta densidade [HDL]).

Os lipídios são componentes essenciais das membranas biológicas. São também encontrados como moléculas livres e reguladores metabólicos que controlam a função e a homeostase celular (CHIANG, 2005). O fígado desempenha um papel vital no metabolismo dos lipídios. Contribui em ambos ciclos exógeno e endógeno do metabolismo de lipídios e no seu transporte através do plasma. O transporte dos triglicérides, do colesterol e de vitaminas lipossolúveis ao tecido periférico e do transporte do colesterol do tecido periférico ao fígado é realizado pelas lipoproteínas (MILLER, 1990).

**Tabela 1 – Classes de Lipoproteínas**

<b>Classes de Lipoproteínas</b>
<b>1. Quilomicrons</b> - partículas mais volumosas, provenientes da dieta, formadas em sua maior parte por triglicerídeos; transportados do intestino delgado até a circulação.
<b>2. Lipoproteínas de baixa densidade (LDL)</b> - fazem o transporte do colesterol plasmático até sua absorção pelas células; em grande quantidade têm a característica de depositarem-se nas paredes dos vasos sanguíneos causando o processo de aterogênese.
<b>3. Lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL)</b> - semelhantes aos quilomicrons, menos volumosas, produzidas no fígado, removendo os triglicerídeos.
<b>4. Lipoproteínas de alta densidade (HDL)</b> - fator de proteção na aterogênese, removem o excesso de colesterol plasmático; níveis elevados são benéficos ao organismo.

Fonte: III Consenso Brasileiro de Dislipidemias - 2001 SBC

O fígado é o principal local de formação e de *clearance* das lipoproteínas. Isto mostra que este está envolvido em muitas etapas do transporte e do metabolismo de lipídios. Assim, na infecção hepática severa, o metabolismo lipídico é profundamente comprometido. Quadros de dislipidemia observados na infecção hepática crônica diferem daqueles encontrados na maioria das outras causas de dislipidemias secundárias, porque as lipoproteínas circulantes estão não somente em quantidades anormais, mas também apresentam composição, mobilidade eletroforética e aparência anormais (MILLER, 1990).

Na literatura, existem estudos que relatam a associação presente entre a infecção do vírus e o metabolismo de lipídios no fígado. Partículas do VHC circulantes no sangue estão associadas às frações de lipoproteínas com diferentes densidades, evidenciando heterogenicidade nas partículas virais, o que poderia refletir a ligação desses vírus ao VLDL e LDL. A literatura suporta a hipótese de que as lipoproteínas



poderiam proporcionar acréscimo da infectividade por certos componentes do soro humano (MEUNIER *et al.*, 2005). Além disso, a relação do VHC com LDL parece aumentar a entrada deste vírus mediada pela SR-BI (receptor *scavenger* tipo B de classe I) e proteger as partículas virais de anticorpos neutralizantes (BARTOSCH *et al.*, 2003).

A primeira etapa do ciclo de vida de um vírus é a ligação da partícula viral à célula hospedeira, para a qual uma interação específica entre um receptor na superfície da célula hospedeira e uma proteína viral de adesão na superfície da partícula é exigida (PILERI *et al.*, 1998).

Thomssen *et al.* (1992) identificaram uma associação entre VHC e LDL no soro humano e demonstraram subseqüentemente uma interação entre complexos de VHC ou de VHC-LDL com o receptor celular da lipoproteína de baixa densidade (LDLr). Entretanto o papel do LDLr não se restringe ao metabolismo lipídico, tendo hoje esse receptor pelo menos trinta ligantes reconhecidos (HERZ *et al.*, 2001).

Enquanto a natureza do receptor de VHC não é conhecida atualmente, a glicoproteína principal E2 do envelope é provavelmente responsável por iniciar o acoplamento do vírus à célula hospedeira (ROSA *et al.*, 1996; ZIBERT *et al.*, 1995; FARCI *et al.*, 1996). O LDLr foi postulado como promotor da entrada viral por diversos membros da família do *flavivirus*, incluindo VHC (AGNELLO *et al.*, 1999). As interações entre a proteína E2 e outras proteínas do VHC com o LDL ou o LDLr ainda não foram descritas.

Estudos anteriores têm demonstrado a associação da infecção pelo VHC com alterações nos níveis de lipoproteínas séricas (SIAGRIS, *et al.*, 2006). A elevação nas concentrações de LDL e colesterol total está relacionada com o aumento do risco

de doenças cardiovasculares, contrastando com as concentrações de HDL, que atuam como fator de proteção contra essas doenças (WILLIAMS, 1996; BEMBEN *et al.*, 2000; KRAUSS, 2004). O LDL é capaz de atravessar a parede endotelial das artérias e sofrer oxidação na camada proximal desta. A consequência disso é a formação de placas de ateroma e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DÂMASO, 2001).

As apolipoproteínas são proteínas que estão em associação com lipídios nas partículas de lipoproteínas e desempenham funções importantes no metabolismo lipoprotéico, como transporte dessas moléculas hidrofóbicas no meio aquoso plasmático, ligação aos receptores específicos na superfície celular para direcionar corretamente os lipídios para os órgãos-alvo e tecidos do organismo, e ativação ou inibição de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico (BEISIEGEL, 1998).

A apolipoproteína B (apo B) está presente nos quilomícrons como apo B-48 e nas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), e lipoproteína de baixa densidade (LDL) como apo B-100, que é responsável pela ligação da lipoproteína ao seu receptor tecidual específico (PACKARD e SHEPHERD, 1997). A apo B é a principal proteína funcional para o transporte de colesterol para as células periféricas (RIFAI *et al.*, 1999). Cerca de 90% da proteína na LDL se constitui de apo B (WALLDIUS e JUNGNER, 2006).

As partículas de LDL, IDL e VLDL apresentam uma molécula de apo B em sua estrutura, e, dessa forma, a concentração plasmática de apo B indica o número total de partículas potencialmente aterogênicas, correlacionando-se como nível de colesterol não-HDL (WALLDIUS e JUNGNER, 2004).

Como os níveis elevados de LDL causam aterosclerose e assim doença cardiovascular isquêmica, estes são usados para identificar indivíduos com risco desta

doença. Entretanto, o componente protéico de partículas de LDL, a apo B, foi utilizada igualmente para prever o infarto fatal do miocárdico em homens e mulheres e a doença cardíaca coronária não fatal nos homens (WALLDIUS *et al.*, 2001; RIDKER *et al.*, 2005). Estes resultados sugerem que a apo B poderia ser um melhor preditivo de eventos cardiovasculares fatais e não fatais do que o LDL. Uma explicação provável para isto é que enquanto o LDL representa uma estimativa da massa do colesterol na fração de LDL somente, o valor para a apo B é uma medida do número total de partículas aterogênicas (que incluem LDL, IDL, VLDL, os quilomícrons e os quilomícrons remanescentes), porque cada um destes contém somente uma única molécula de apo B (TALMUD *et al.*, 2002).

O risco de aterosclerose parece estar relacionado mais diretamente ao número de partículas aterogênicas circulantes que penetram na parede arterial do que às concentrações de colesterol nestas frações, o que sugere que a apo B seja um melhor preditivo do risco de complicações vasculares do que as concentrações de colesterol na fração de LDL. Assim, a apo B é um preditivo mais confiável do que o colesterol de LDL nos quadros de doença isquêmica cardíaca, infarto do miocárdico e doença vascular cerebral isquêmica (PISCHON *et al.*, 2005).

Desta forma, a hipótese a ser avaliada nesse estudo é se o VHC predispõe o indivíduo portador ao desequilíbrio lipídico, favorecendo assim, o aparecimento de complicações vasculares.

## **OBJETIVOS**

---

### **Objetivo Geral:**

O objetivo geral foi estudar a influência da viremia (quantidade de vírus/mL de sangue) e genótipos do vírus da hepatite C sobre o metabolismo lipídico, investigando os níveis séricos de lipoproteínas (LDL; HDL; VLDL; colesterol total; triglicérides) e apolipoproteína B em portadores crônicos (hepatopatas) desta infecção.

### **Objetivos Específicos:**

- Avaliar o perfil lipídico de homens e mulheres, em idade adulta, portadores do VHC, através da análise de lipoproteínas séricas;
- Correlacionar os resultados encontrados com o genótipo do VHC, viremia e sexo dos pacientes;
- Avaliar possíveis correlações entre a presença do VHC e alterações lipídicas e, assim, a predisposição dos indivíduos analisados a apresentar complicações vasculares.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

### **Casuística:**

De acordo com o protocolo nº 03/2007 e o parecer nº 15/2008, o projeto de pesquisa foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, e por se encontrar adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, recebeu parecer favorável à sua execução.

Como amostragem teste, foram utilizadas amostras sorológicas coletadas no período entre agosto de 2007 e agosto de 2008, provenientes de portadores da infecção pelo VHC (n=150), moradores da cidade de Araraquara, Araras, Boa Esperança do Sul, Borborema, Leme, Limeira, Matão, Piracicaba, Pirassununga, Rio Claro ou Taquaritinga.

O grupo controle (n=20) foi composto por doadores de sangue do Hemonúcleo Regional de Araraquara da Coordenadoria Análises Clínicas e Hemoterapia do Núcleo de Atendimento à Comunidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP/Araraquara.

Todas as amostras foram encaminhadas para diagnóstico sorológico ou molecular da infecção pelo VHC ou para triagem sorológica de doadores de sangue ao Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP/Araraquara.

**Critérios para Inclusão:**

Grupo Hepatite: ser portador da infecção pelo vírus da hepatite C, comprovado por sorologia anti-VHC, sem tratamento, conforme consenso estabelecido pelo Programa Estadual de Hepatites Virais, e estar em acompanhamento médico com solicitação da pesquisa do vírus no soro.

Grupo Controle: ser negativo para todos os testes sorológicos definidos para a doação de sangue/hemocomponentes (hepatites B e C, Chagas, HIV, HTLV, Sífilis), realizados pelo Hemonúcleo Regional de Araraquara - NAC/FCF/UNESP.

**Critérios para Exclusão:**

Grupo Hepatite: foram excluídos da pesquisa todos os pacientes que apresentaram o teste sorológico para a hepatite C inconclusivo ou negativo.

Grupo Controle: foram excluídos todos os indivíduos que apresentaram em qualquer teste sorológico de banco de sangue um resultado inconclusivo ou positivo.

**3.1. TESTE QUALITATIVO COMERCIAL PARA DETECÇÃO DO RNA-VHC**

O teste AMPLICOR Hepatitis C Virus Test, version 2.0 (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA) é um ensaio qualitativo *in vitro* e baseia-se em cinco processos principais: preparação da amostra, obtenção do DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa do RNA alvo, amplificação por PCR (reação da polimerase em cadeia) do cDNA alvo, hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas e detecção destes produtos, por determinação colorimétrica. Os procedimentos utilizados seguiram as especificações do fabricante e estão apresentados abaixo resumidamente.

## **3.2. PREPARO DAS AMOSTRAS**

O RNA do vírus foi isolado a partir do soro por lise de partículas virais, através da ação caotrópica do tampão (Tris-HCl pH 6,4 contendo 68% de Tiocianato de Guanidina e 3% de Ditioneitol). Após a lise seguiu uma precipitação do RNA viral com álcool. Foi utilizado um controle interno disponível no kit para garantir a perfeita exequibilidade do processo de extração e amplificação.

## **3.3. TRANSCRIÇÃO REVERSA E AMPLIFICAÇÃO POR PCR**

### **3.3.1. SELEÇÃO DO ALVO**

A região 5' não traduzida do genoma do VHC foi escolhida, uma vez que esta apresenta conservação máxima da seqüência de RNA entre os genótipos conhecidos. O teste utilizou oligonucleotídeos (KY78: antisenso e KY80: senso) para definir uma seqüência de 244 nucleotídeos dentro da 5' *UTR*.

### **3.3.2. TRANSCRIÇÃO REVERSA**

As reações de transcrição reversa e de amplificação foram efetuadas utilizando a enzima recombinante termoestável DNA polimerase de *Thermus thermophilus* (rTth pol). Na presença de manganês e em condições de tampão adequadas a rTth pol apresenta atividades de transcriptase reversa e de DNA polimerase, permitindo que tanto a transcrição reversa como a amplificação por PCR ocorra na mesma mistura de reação.

As amostras processadas foram adicionadas à mistura de amplificação em tubos de ensaio, nos quais ocorreram a transcrição reversa e a amplificação por PCR. O oligonucleotídeo KY78 encontra-se biotilado na extremidade 5' e o KY80 não se

apresenta biotilado. A mistura de reação foi aquecida a 50°C durante 5 minutos para permitir que o KY78 se ligasse especificamente no RNA alvo e, na presença de desoxinucleosídeos trifosfatos (dNTP), a rTth pol estende o oligonucleotídeo ligado dando origem a cDNA complementar ao RNA alvo.

### **3.3.3. AMPLIFICAÇÃO DO ALVO**

Após a transcrição reversa a mistura de reação foi aquecida a 90°C durante 10 segundos para desnaturar o híbrido RNA: cDNA e expor as seqüências alvo para anelamento com os oligonucleotídeos iniciadores. À medida que o híbrido é desnaturado, o KY80 liga especificamente à cadeia de cDNA. À temperatura de 58°C durante 25 segundos a rTth pol alonga e uma segunda cadeia de DNA é sintetizada. Assim, completa-se o primeiro ciclo de PCR, produzindo uma cópia de DNA de cadeia dupla do RNA da região alvo. A mistura de reação foi novamente aquecida (90°C durante 10 segundos) para separar as duplas cadeias de DNA produzidas e expor novamente as seqüências alvo. À medida que a mistura aquece, os oligonucleotídeos KY80 e KY78 ligam-se ao DNA alvo. A rTth pol, na presença de dNTPs em excesso, estende a cadeia nucleotídica a partir dos oligo-iniciadores ligados das fitas alvo, a 58°C durante 25 segundos, dando origem a uma molécula de DNA de dupla cadeia com 244 pares de bases. Esse processo foi repetido durante 37 ciclos.

### **3.3.4. REAÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO**

Após amplificação por PCR, o produto foi desnaturado pela adição da solução de desnaturação contendo 1,6% de NaOH, o que ocasiona a ruptura das pontes de hidrogênio entre os pares de bases para formar um DNA fita simples. Aliquotas deste



produto foram adicionadas em poços individuais de microplaca revestida de sonda específica para o VHC (KY150). Os produtos de PCR desnaturados, marcados com biotina, foram hibridizados com as sondas específicas para o alvo fixadas aos poços das microplacas.

### **3.3.5. REAÇÃO DE DETECÇÃO**

Após a reação de hibridização, a microplaca foi lavada para remover o material não fixado e foi adicionado o conjugado avidina-peroxidase a cada poço. A avidina do conjugado liga-se à fita de DNA através da reação com biotina, capturada pela sonda específica. A placa foi lavada novamente para remover o conjugado não ligado e uma solução de substrato contendo peróxido de hidrogênio e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) adicionada aos poços. Na presença de peróxido de hidrogênio, a peroxidase catalisa a oxidação do TMB para formar um complexo colorido. A reação foi interrompida por adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 4,9%, e a absorbância determinada a 450nm.

### **3.3.6. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**

O critério para interpretação foi baseado na leitura da absorbância a 450nm ( $A_{450}$ ), se inferior a 0,3 considerou RNA viral não detectado (ND); absorbância maior ou igual a 1,0, RNA viral detectado (D); e entre 0,3 e 1,0, inconclusivo (I). Em situações em que o resultado é inconclusivo é realizada uma repetição do procedimento utilizando nova alíquota da amostra.

### 3.3.7. REAÇÃO QUANTITATIVA PARA RNA-VHC

A determinação da viremia plasmática (quantidade de vírus/mL de sangue) foi feita pela amplificação de sinal na reação de *branched DNA* (B-DNA-Bayer). Este método é realizado pelo nosso Laboratório, como parte do Programa Estadual de Hepatites Virais – Rede de Laboratórios de Biologia Molecular do Estado de São Paulo.

### 3.4. GENOTIPAGEM DO VHC

O método comercial utilizado foi o INNO – LiPA HCV II (Innogenetics, Bélgica). Este teste permite a identificação de 6 genótipos do VHC e seus subtipos. O princípio desse ensaio é baseado na variação encontrada na região 5' *UTR* de diferentes genótipos. As sondas tipo específicas possuem uma cauda poli-T (timina), ligada à membrana de nitrocelulose. Os produtos amplificados por PCR com oligonucleotídeos iniciadores, marcados com biotina na posição 5', hibridizam-se apenas com a seqüência da sonda específica sobre a membrana de nitrocelulose. Para a revelação desta reação foi utilizada estreptavidina conjugada a fosfatase alcalina. A estreptavidina se liga à biotina do híbrido previamente formado na membrana de nitrocelulose e o substrato cromógeno BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine) /NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride) produz um precipitado púrpuro, permitindo a identificação do tipo e subtipo viral.

### 3.5. DOSAGEM DE LÍPOPROTEÍNAS SÉRICAS

Foram realizadas dosagens de colesterol total, HDL e triglicérides nas amostras de pacientes testes (116 homens e 34 mulheres), conforme distribuídos na Tabela 2.

**Tabela 2** – Distribuição entre sexo e faixa etária

FAIXA ETÁRIA	MASCULINO		FEMININO	
	n=116	%	n=34	%
20 – 30	2	1,7	4	12
31 – 40	40	34,4	8	23,5
41 – 50	51	44	8	23,5
51 – 60	16	13,9	11	32,3
Acima de 61	7	6	3	8,7

Após preenchimento dos termos de consentimento livre e esclarecido e de doação de material biológico pelos pacientes, as amostras de sangue foram colhidas em tubo gel e centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos. Realizada a centrifugação, o soro das amostras foi fracionado em tubos e congelado a -80°C até que tivessem início as análises.

As amostras controles foram utilizadas para comparação (10 homens e 10 mulheres saudáveis em idade adulta) e se apresentaram dentro dos intervalos de referência considerados desejáveis, como apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3** – Valores de Referência em Adultos

PERFIL LIPÍDICO - VALORES DE REFERÊNCIA EM ADULTOS (>ou = 20 ANOS)					
Valores em mg/dL					
	Colesterol Total	LDL	HDL	VLDL	Triglicerídeos
<b>Desejáveis</b>	< 200	< 130	> 40	< 30	< 150
<b>Limítrofes</b>	200 – 239	130 – 159	-	30 – 40	150 – 199
<b>Aumentados</b>	> ou = 240	> ou = 160	-	> 40	> ou = 200

Diretrizes brasileiras para o tratamento de dislipidemias e prevenção da aterosclerose-SBC 2001

As análises das amostras testes e controles foram realizadas em aparelho de automação COBAS MIRA PLUS (ROCHE DIAGNOSTICS) segundo recomendações do fabricante e dos reagentes, utilizando-se kits enzimáticos específicos para colesterol total, HDL e triglicérides.

### **Dosagem de Colesterol total**

No presente método os ésteres de colesterol existentes na amostra são hidrolisados pela enzima colesterol esterase, produzindo o colesterol livre. A enzima colesterol oxidase, em presença de oxigênio, catalisa a oxidação do colesterol livre, produzindo o peróxido de hidrogênio. A enzima peroxidase catalisa a oxidação do reagente fenólico (fenol) pelo peróxido de hidrogênio formado, em presença de 4 aminoantipirina, produzindo um composto rosa (quinonimina) com máximo de absorção em 505 nm.

### **Dosagem de HDL**

O anticorpo anti  $\beta$ -lipoproteína humana presente no Reagente 1 se liga às lipoproteínas (LDL, VLDL e Quilomícrons) deixando a lipoproteína HDL livre. Quando é adicionado o Reagente 2, somente o Colesterol HDL reage com a cadeia enzimática colesterol esterase e colesterol oxidase, formando o peróxido de hidrogênio. Este, em presença de peroxidase, forma um complexo de cor azul sob condensação oxidativa com F-DAOS e 4-aminoantipirina. A concentração do HDL presente na amostra é proporcional à absorbância, medida a 600 nm.

## **Dosagem de Triglicérides**

Os triglicérides são hidrolisados pela lipase lipoprotéica e o glicerol liberado é fosforilado pela glicerolquinase formando glicerolfosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona e água oxigenada por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Através de reação de copulação oxidativa catalisada pela peroxidase, a água oxigenada reage com o a 4-aminoantipirina (4-AMP) e 4-clorofenol, produzindo a quinoneimina (vermelha) cuja absorvância, medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de triglicérides.

## **Concentrações de LDL e VLDL**

As concentrações de LDL e VLDL foram calculadas pela equação de Friedwald (FRIEDWALD; LEVY; FREDERICKSON, 1973), que foi utilizada para amostras que apresentaram valor menor do que 400 mg/dl para triglicérides, já que em pacientes com hipertrigliceridemia a equação é imprecisa. A equação de Friedwald está apresentada abaixo.

### **Equação de Friedwald**

Colesterol LDL = Colesterol Total - (HDL + VLDL)

Colesterol VLDL = Triglicérides / 5

## **3.6. DOSAGEM DA APOLIPOPROTEÍNA B**

### **3.6.1. IMUNOTURBIDIMETRIA**

A imunoturbidimetria é um ensaio imunométrico que utiliza a imunoprecipitação e a dispersão da luz para quantificar analitos presentes no soro. A

formação de imunoprecipitados leva à diminuição da intensidade do feixe de luz incidente que atravessa a solução e a sua presença leva à turvação da reação.

A concentração de apo B das amostras testes e controles foi determinada pelo método de imunoturbidimetria (ou imunoensaio turbidimétrico), utilizando-se kits enzimáticos específicos, em aparelho de automação COBAS MIRA PLUS (ROCHE DIAGNOSTICS). Antígenos apo B presentes na amostra originam uma aglutinação imunológica com os anticorpos anti-apo B presentes no reagente. O grau de aglutinação é proporcional à concentração de apo B na amostra e pode ser medido por turbidimetria.

Em uma reação imunoquímica, as apolipoproteínas presentes no soro formam complexos imunes insolúveis com anticorpos específicos. Esses complexos dispersam um feixe de luz incidente que atravessa essa suspensão na célula de reação no analisador espectrofotométrico. A porção dessa luz dispersa é captada por um fotodiodo através de um sistema óptico de lentes com ângulo entre 130 e 240. Um diodo emissor de luz infravermelha, com comprimento de onda de 340 nm funciona como fonte de luz primária. O sinal captado pelo fotodiodo é convertido em sinal elétrico. O sinal de voltagem, diretamente proporcional à intensidade da luz dispersa, é, por sua vez, convertido em unidade digital (bits) e este por sua vez é comparado com os valores correspondentes da curva padrão de concentrações conhecidas das respectivas apolipoproteínas.

Para a apo B foi construída uma curva padrão utilizando-se o soro padrão do mesmo fabricante. A curva de referência foi construída por calibração de múltiplos pontos através de diluições seriadas do soro calibrador em diluente de reação tampão salina fosfato.

Segundo DATI *et al.* (1989), os valores de referência para apo B são:

- Homens: 60 – 138mg/dL
- Mulheres: 52 – 129mg/dL

### 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Para averiguar a diferença entre as médias de cada classe de lipoproteína analisada (colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicérides e apo B) e seus respectivos grupos controles dentro de cada genótipo, foi utilizada uma Análise de Variância Hierárquica “*Nested Analysis of Variance*” ( $\alpha = 0,05$ ) que segundo Sokal & Rohlf (1995) é definida por:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_{ij} + \epsilon_{ijk},$$

onde  $Y_{ijk}$  é a  $k^{\text{ésima}}$  observação dentro do  $j^{\text{ésimo}}$  subgrupo do  $i^{\text{ésimo}}$  grupo;  $\mu$  é a média paramétrica da população,  $A_i$  é a contribuição aleatória do  $i^{\text{ésimo}}$  grupo do maior nível A,  $B_{ij}$  é a contribuição aleatória do  $j^{\text{ésimo}}$  subgrupo (nível B) do  $i^{\text{ésimo}}$  grupo, e  $\epsilon_{ijk}$  é o termo de erro do  $k^{\text{ésimo}}$  item no  $j^{\text{ésimo}}$  subgrupo do  $i^{\text{ésimo}}$  grupo. Foi assumido que  $A_i$ ,  $B_{ij}$  e  $\epsilon_{ijk}$  são normalmente distribuídos, com médias zero e variâncias de  $\sigma^2_A$ ,  $\sigma^2_{BCA}$  e  $\sigma^2$  respectivamente. Para atender as pressuposições do modelo os valores aferidos foram transformados em  $\text{Log}_e(x+1)$ .

Após a realização da análise citada, os resultados foram submetidos à análise de variância de Mann Whitney, sendo adotado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). A correlação de Pearson foi utilizada para determinar a relação entre a quantidade de vírus e a variação de HDL, LDL e apo B no grupo portador desta infecção. Em ambos os métodos, a hipótese a ser avaliada é se o vírus da hepatite C predispõe o indivíduo ao desequilíbrio lipídico, favorecendo assim o surgimento de complicações vasculares.

## RESULTADOS

A Tabela 4 apresenta a análise de 150 amostras de pacientes portadores crônicos do VHC subdivididos por sexo (116 homens e 34 mulheres) e genótipos do VHC.

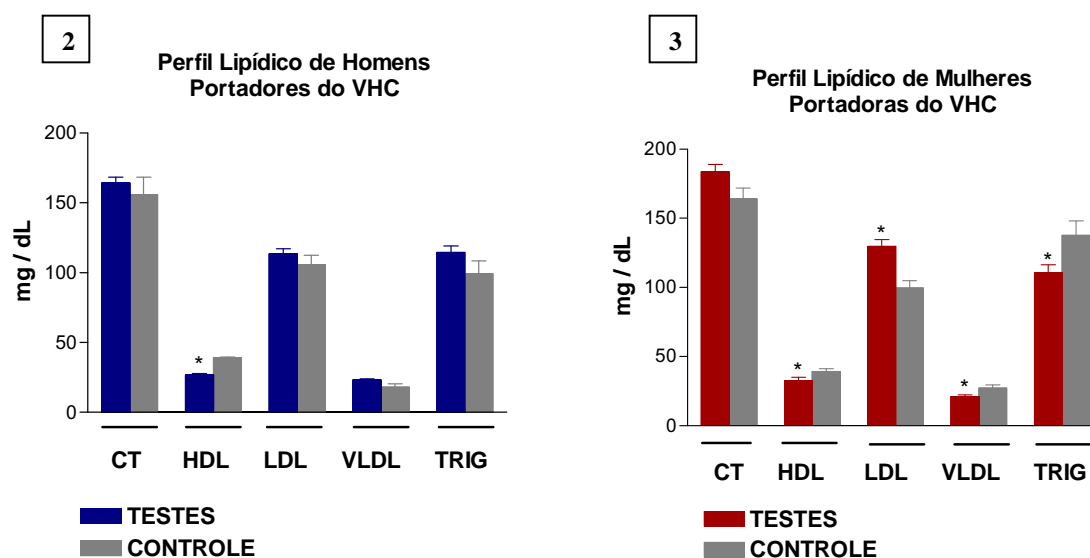
**Tabela 4** – Distribuição de sexo e genótipos do VHC. Número total 150.

	GENÓTIPOS (n=150)						
	1	1a	1b	1a/1b	3a	2a/2c	2b
<b>MULHERES</b> (n=34)	1	8	12	3	10	-	-
<b>HOMENS</b> (n=116)	4	47	16	6	41	1	1

Através da análise de variância hierárquica realizada, foi possível concluir que existem diferenças estatisticamente significantes entre as médias dos resultados das lipoproteínas e entre as médias das amostras utilizadas como controle, dentro de cada genótipo analisado (amostras testes x controles).

Em seguida, a análise de variância de Mann Whitney mostrou que o perfil lipídico de homens portadores do VHC com genótipo 1, 2 ou 3 e seus subtipos apresentou, em média, diminuição significativa nos níveis de HDL (36%) em relação ao grupo controle. Já o perfil lipídico de mulheres portadores do VHC de mesmos genótipos mostrou, em média, alterações mais importantes, que foram observadas nos níveis de HDL (17%), LDL (39%), VLDL (28%) e triglicérides (21%) (Figuras 2 e 3).



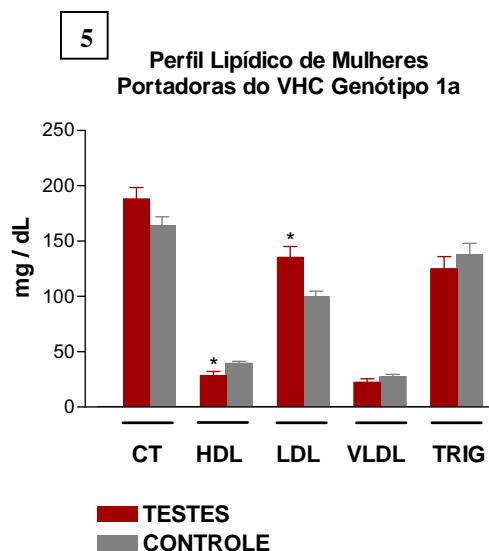
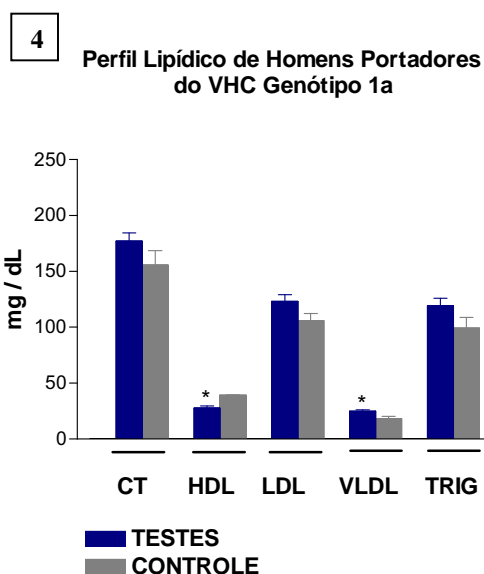


**Figuras 2 e 3** – Perfil lipídico (mg/dL) de pacientes homens (n=116) e mulheres (n=34), em idade adulta, portadores do VHC genótipos 1, 2 e 3 (e subtipos). Resultados analisados pelo teste de Mann Whitney ( $p > 0,05$ ), quando comparados com o grupo controle.

Valores de referência: CT < 200 mg/dL; LDL < 130 mg/dL; HDL > 40 mg/dL; VLDL < 30 mg/dL; TRIG < 150 mg/dL

\* Alterações significantes.

Em seguida, as análises mostraram que o perfil lipídico de homens portadores do VHC genótipo 1a apresentou diminuição significativa nos níveis de HDL (29%) e aumento nos níveis de VLDL (27%) em relação ao grupo controle, enquanto o perfil lipídico de mulheres portadoras do vírus de mesmo genótipo apresentou diminuição nos níveis de HDL (27%) e aumento nos níveis de LDL (26%) em relação ao grupo controle (Figuras 4 e 5).

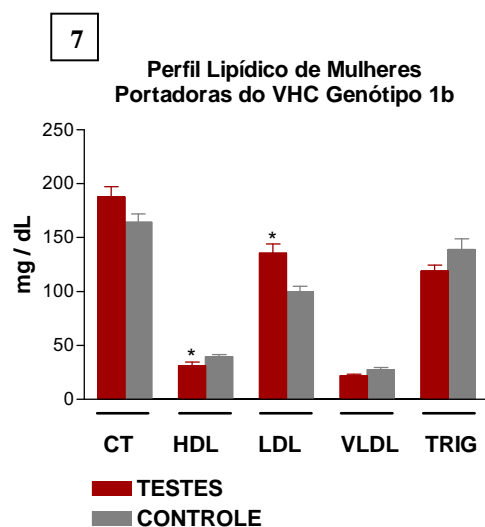
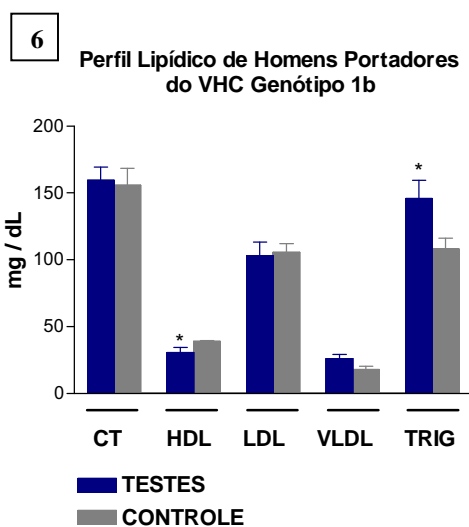


**Figuras 4 e 5** – Perfil lipídico (mg/dL) de pacientes homens (n=47) e mulheres (n=8), em idade adulta, portadores do VHC genótipo 1a. Resultados analisados pelo teste de Mann Whitney ( $p > 0,05$ ), quando comparados com o grupo controle.

Valores de referência: CT < 200 mg/dL; LDL < 130 mg/dL; HDL > 40 mg/dL; VLDL < 30 mg/dL; TRIG < 150 mg/dL

\* Alterações significantes.

Na análise do perfil lipídico de homens portadores do VHC genótipo 1b, foi possível observar diminuição nos níveis de HDL (23%) e aumento nos níveis de triglicérides (26%) em relação ao grupo controle. Já o perfil lipídico de mulheres portadoras do VHC de mesmo genótipo apresentou diminuição nos níveis de HDL (21%) e aumento nos níveis de LDL (27%) em relação ao grupo controle (Figuras 6 e 7).

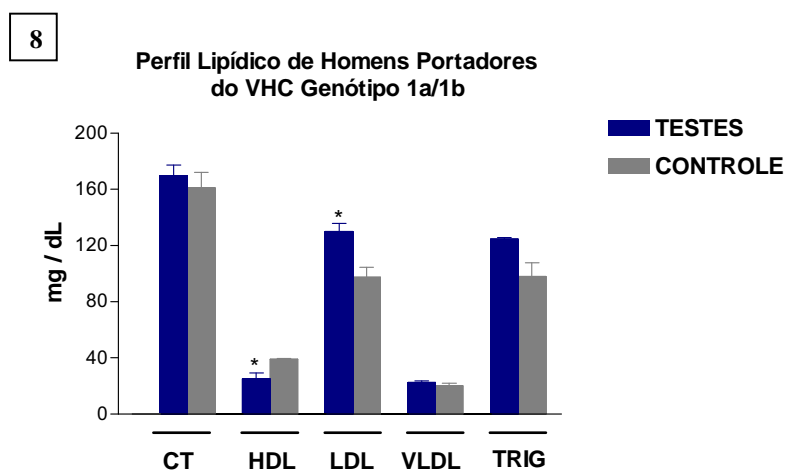


**Figuras 6 e 7** – Perfil lipídico de pacientes homens (n=16) e mulheres (n=12), em idade adulta, portadores do VHC genótipo 1b. Resultados analisados pelo teste de Mann Whitney ( $p > 0,05$ ), quando comparados com o grupo controle.

Valores de referência: CT < 200 mg/dL; LDL < 130 mg/dL; HDL > 40 mg/dL; VLDL < 30 mg/dL; TRIG < 150 mg/dL

\* Alterações significantes.

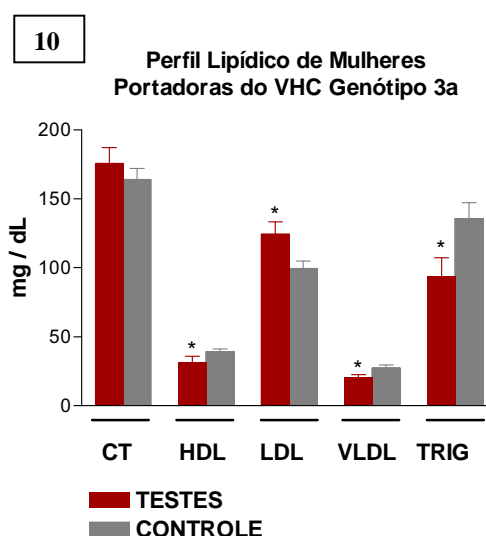
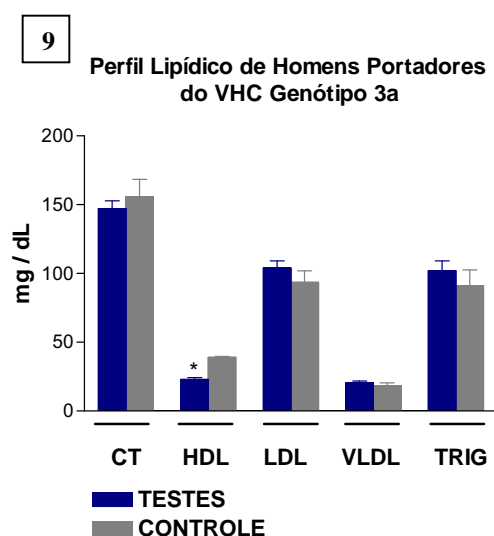
O perfil lipídico de homens portadores do VHC genótipo 1a/1b apresentou níveis diminuídos de HDL (36%) e níveis aumentados de LDL (25%) em relação ao grupo controle (Figura 8).



**Figura 8** – Perfil lipídico de pacientes homens (n=6) em idade adulta, portadores do VHC genótipo 1a/1b. Resultados analisados pelo teste de Mann Whitney ( $p > 0,05$ ), quando comparados com o grupo controle. Valores de referência: CT < 200 mg/dL; LDL < 130 mg/dL; HDL > 40 mg/dL; VLDL < 30 mg/dL; TRIG < 150 mg/dL

\* Alterações significantes.

O perfil lipídico de homens portadores do VHC genótipo 3a mostra diminuição nos níveis de HDL (41%), enquanto que no perfil lipídico de mulheres que apresentavam mesmo genótipo, as alterações foram mais significantes. Foi observado diminuição nos níveis de HDL (21%), VLDL (25%) e triglicérides (27%) e aumento nos níveis de LDL (20%) em relação ao grupo controle, alterações semelhantes às descritas por Ooik *et al.* (2005) (Figuras 9 e 10).

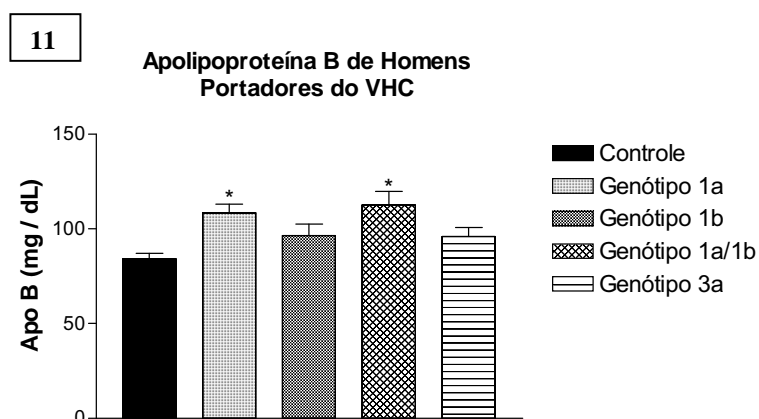


**Figuras 9 e 10** – Perfil lipídico de pacientes homens (n=41) e mulheres (n=10), em idade adulta, portadores do VHC genótipo 3a. Resultados analisados pelo teste de Mann Whitney ( $p > 0,05$ ), quando comparados com o grupo controle.

Valores de referência: CT < 200 mg/dL; LDL < 130 mg/dL; HDL > 40 mg/dL; VLDL < 30 mg/dL; TRIG < 150 mg/dL

\* Alterações significantes.

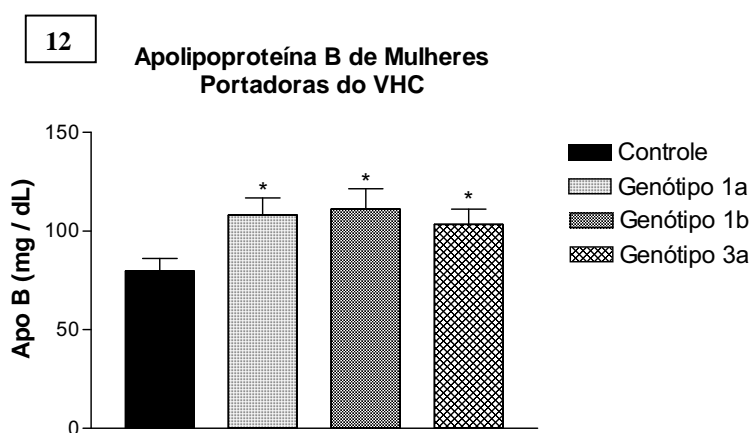
Foi realizada a análise de Apo B em um grupo de homens portadores do VHC genótipos 1 e 3 (e subtipos) e em um grupo de mulheres portadoras do VHC de mesmos genótipos (Figuras 11 e 12). Novamente, as alterações mais importantes foram observadas no grupo composto por mulheres, onde foi possível observar aumento nos níveis de Apo B nas portadoras dos genótipos 1a (35%), 1b (36%) e 3a (29%), em relação ao grupo controle. No grupo composto por homens, também foi observado aumento nos níveis de Apo B nos portadores dos genótipos 1a (29%), 1b (14%), 1a/1b (33%) e 3a (28%), quando comparados com o grupo controle.



**Figura 11** - Pesquisa de Apo B em pacientes homens (n=110) em idade adulta, portadores do VHC genótipos 1 e 3 (e subtipos). Resultados analisados pelo teste de Mann Whitney ( $p>0,05$ ), quando comparados com o grupo controle.

Valores de referência: homens: 60 – 138mg/dL; mulheres: 52 – 129mg/dL

\* Alterações significantes.



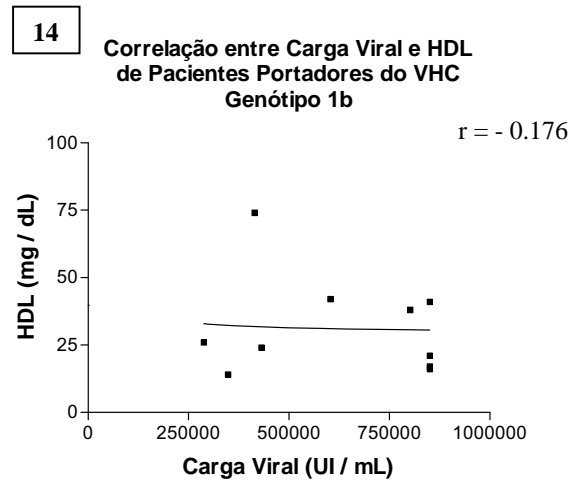
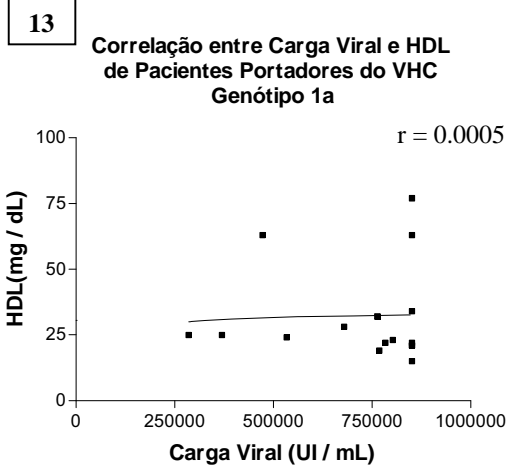
**Figura 12** - Pesquisa de Apo B em pacientes mulheres (n=30) em idade adulta, portadoras do VHC genótipos 1 e 3 (e subtipos). Resultados analisados pelo teste de Mann Whitney ( $p>0,05$ ), quando comparados com o grupo controle.

Valores de referência: homens: 60 – 138mg/dL; mulheres: 52 – 129mg/dL

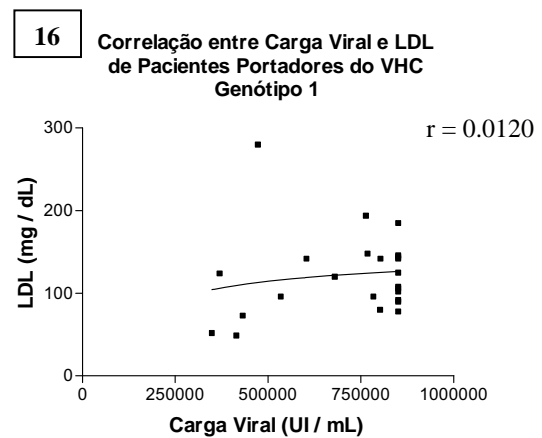
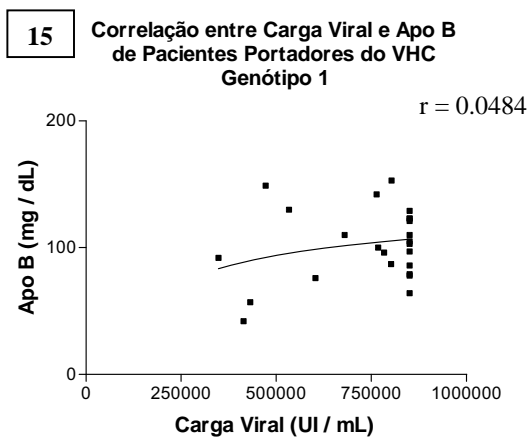
\* Alterações significantes.

Para correlacionar os dados da carga viral com o perfil lipídico, dois grupos foram analisados, ambos com pacientes homens e mulheres em idade adulta, o primeiro com portadores do VHC genótipo 1a (n = 14) e o segundo com portadores do VHC genótipo 1b (n = 9). Os demais pacientes portadores do genótipo 1 (n=74) foram excluídos por apresentarem carga viral indetectável ou abaixo de 250.000 UI/mL pelo método utilizado. As cargas virais dos dois grupos analisados foram correlacionadas com os valores encontrados de HDL, LDL e Apo B, por terem sido essas lipoproteínas e proteína a apresentarem as alterações mais significativas.

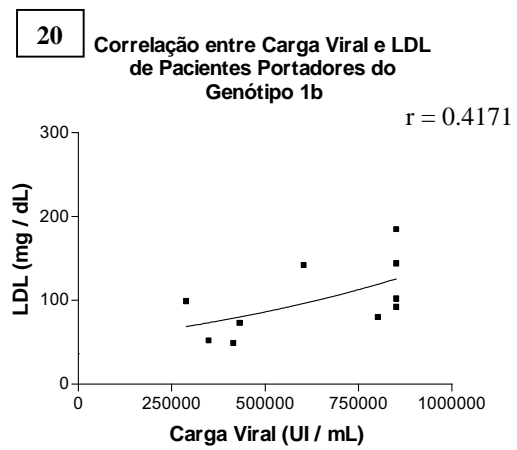
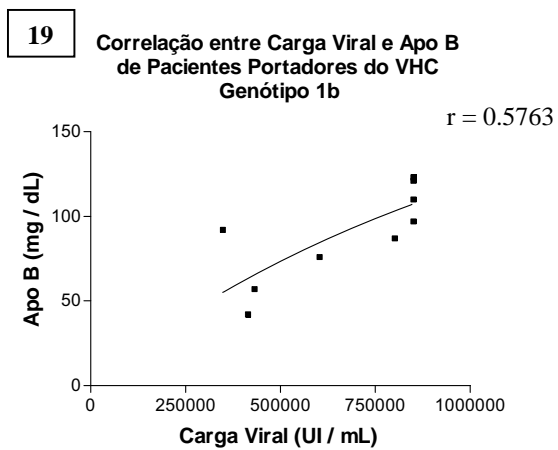
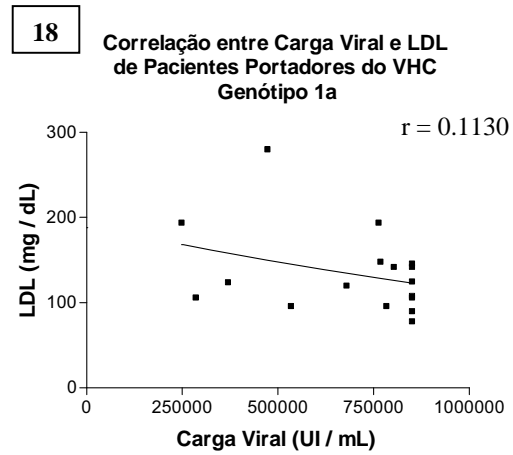
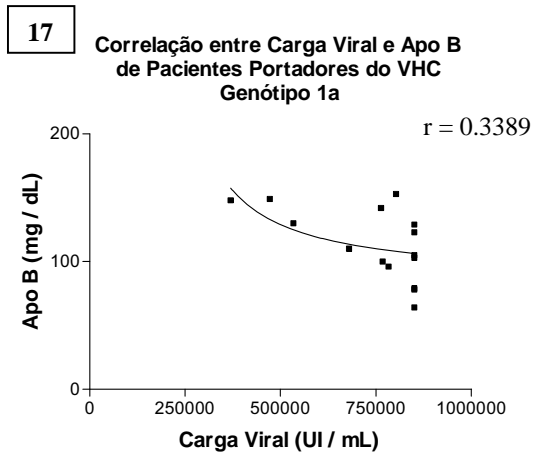
Foi possível observar que somente ocorreu correlação entre a viremia e os níveis de apo B ( $r = 0,5763$ ) nos portadores do genótipo 1b. Este resultado é bastante condizente com este tipo viral, que tem se mostrado refratário ao tratamento com ribavirina e INF (Figura 19). Nas demais Figuras (13, 14, 15, 16, 17, 18 e 20) observa-se que não ocorreu correlação entre a viremia e os níveis de HDL, LDL e apo B nos portadores de genótipo 1a e 1b.



**Figuras 13 e 14** – Correlação entre os valores das cargas virais e os níveis séricos de HDL de pacientes homens e mulheres em idade adulta, portadores do VHC genótipos 1a (n=14) e 1b (n=9), através da Correlação de Pearson.







**Figuras 15, 16, 17, 18, 19 e 20** – Correlação entre os valores das cargas virais e os níveis séricos de LDL e Apo B de pacientes homens e mulheres em idade adulta, portadores do VHC genótipo 1 e subtipos (n=24), através da Correlação de Pearson.

## DISCUSSÃO

**Tabela 5** – Alterações encontradas nas classes de lipoproteínas e apo B de acordo com sexo dos pacientes e genótipos do VHC.

	HOMENS (n=116)				MULHERES (n=34)		
	1a	1b	1a/1b	3a	1a	1b	3a
<b>CT</b>							
<b>LDL</b>			X		X	X	X
<b>HDL</b>	X	X	X	X	X	X	X
<b>VLDL</b>	X						X
<b>TRIG</b>		X					X
<b>Apo B</b>	X		X		X	X	X

A infecção pelo VHC é, atualmente, a principal causa de doença hepática crônica em todo o mundo, pois a persistência desta infecção pode levar à hepatite crônica complicada pela cirrose e/ou carcinoma hepático (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2005). A cirrose é uma das principais causas de morte no mundo ocidental. No Estado de São Paulo registrou-se em 2002, uma taxa de mortalidade de 10,31 por 100.000 habitantes (MAEDA *et al.*, 2008).

Fernández Rodriguez *et al.* (2006) reportaram que as infecções hepáticas crônicas produzidas pelo genótipo 3 do VHC, estão fortemente associadas com alterações sobre o metabolismo lipídico. Estas alterações estão relacionadas à carga viral, são reversíveis e apresentam uma resposta viral sustentada.

Neste trabalho, obtivemos resultados concordantes com aqueles descritos por Fernández Rodriguez *et al.* (2006), onde as alterações mais relevantes foram observadas nos níveis séricos das frações lipídicas HDL e LDL, principalmente nos pacientes portadores do VHC genótipo 3a (Fig.10).

Ooik *et al.* (2005) analisaram a dislipidemia em diferentes infecções hepáticas, como: hepatite crônica, cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e infecção hepática metastática. Tal estudo demonstrou que as alterações no metabolismo lipídico estão presentes em diferentes infecções hepáticas, sendo que na hepatite crônica, na cirrose e no carcinoma hepatocelular, os triglicerídeos e os níveis de colesterol estão diminuídos enquanto a fração do LDL está aumentada.

No presente estudo, encontramos níveis elevados de LDL e diminuídos de HDL nos indivíduos portadores de infecção hepática crônica causada pelo VHC (Figs. 4 à 10), sendo que tais achados confirmam os resultados obtidos por Ooik *et al.*. Porém, nossos resultados são discordantes daqueles mostrados por Siagris *et al.* (2006), onde pacientes portadores da hepatite C crônica apresentaram significantes reduções nos níveis de lipoproteínas séricas; não apenas HDL, mas também colesterol total, LDL e triglicérides. Estes autores afirmaram, no entanto, que os mecanismos pelos quais a infecção pelo VHC pode reduzir os níveis de lipoproteínas séricas ainda permaneciam desconhecidos.

A dislipidemia parece ser mais evidente em mulheres portadoras do genótipo 3a do VHC, o que, para alguns autores, está diretamente relacionada à carga e a resposta viral ao tratamento (JARMAY *et al.*, 2005; RUBBIA-BRANDT *et al.*, 2001). Esta mesma constatação foi corroborada por Siagris *et al.* (2004).

De acordo com Molina *et al.* (2009), as doenças cardiovasculares são atualmente a principal causa de morte no mundo, e, estima-se que em 2030 serão responsáveis por 14,2% das *causa mortis*. O aumento nas concentrações de LDL tem se relacionado ao risco de doenças cardiovasculares (DAC), ao contrário das concentrações de HDL, que atuam como um fator de proteção para estas doenças (WILLIAMS, 1996; SIERVOGEL *et al.*, 1998; BEMBEN *et al.*, 2000; KRAUSS, 2004). A etiopatogênese da DAC tem como principal fator a oxidação do LDL na camada íntima arterial e, como conseqüência, a formação de placas ateromatosas (DÂMASO, 2001). Em geral, a redução de 1% nos níveis séricos de LDL está associado à diminuição de 2-3% no risco da DAC (LEON e SANCHEZ, 2001).

Na população estudada observamos correlação positiva entre a carga viral de pacientes portadores do genótipo 1b do VHC e os níveis séricos de apo B ( $r = 0,5763$ ) com uma tendência positiva entre a carga viral e os níveis de LDL ( $r = 0,4171$ ). Nestes resultados foi possível observar um aumento de 24.5% nos níveis de LDL com relação ao grupo controle e, considerando a informação precedente fornecida pelos autores Leon e Sanchez (2001), conseqüentemente foi pressuposto que o risco de pacientes portadores do VHC desenvolverem complicações vasculares é elevado, considerando que o aumento nos níveis de LDL está associado com o risco de desenvolvimento de doenças cardíacas e esse risco é mais pronunciado nos pacientes portadores do VHC genótipo 1b (DÂMASO, 2001), o qual se apresenta refratário ao tratamento com interferon e ribavirina quando comparado aos demais genótipos do VHC.

Na última década, a atenção tem se voltado para a determinação da concentração sérica da apo B, que representa com mais propriedade o número de

partículas aterogênicas. A apo B é essencial para ligação das partículas de LDL aos receptores celulares, permitindo a entrada de LDL nas células; logo um excesso de apo B representa um fator desencadeante para o processo aterogênico (FORTI e DIAMENT, 2007).

Em nosso estudo, foi possível observar um aumento de 29% nos níveis de apo B. Desta forma, a correlação positiva encontrada entre os níveis séricos de apo B e a viremia dos pacientes portadores do genótipo 1b, reforça a idéia de que os indivíduos acometidos pelo VHC estão mais vulneráveis ao desenvolvimento de processos aterogênicos (SHAH, 2001). Como a infecção pelo VHC leva à dislipidemia, é razoável sugerir que um quadro aterogênico existe durante a infecção pelo VHC. Portanto, uma análise cuidadosa do perfil lipídico pode auxiliar no diagnóstico da severidade da infecção hepática e igualmente atuar como um bom sinal prognóstico, uma vez que a relação entre a infecção pelo VHC e níveis elevados de LDL e apo B pode ser clinicamente relevante por aumentar o risco de desenvolvimento de doenças associadas à hiperlipidemia, principalmente doenças cardíacas ateroscleróticas, por isso sua análise deve ser realizada em todos os casos de infecção hepática avançada.

Os resultados obtidos nesse estudo corroboram para as evidências de que a infecção pelo VHC esteja associada direta ou indiretamente com alterações no metabolismo lipídico, principalmente diminuição nos níveis plasmáticos de HDL e aumento nos níveis de LDL e Apo B. Tais achados se mostraram mais relevantes nos pacientes portadores do genótipo 3a do VHC, principalmente no grupo composto por mulheres. Neste caso, a avaliação do perfil lipídico nos portadores crônicos do VHC, e, especialmente quando relacionada ao genótipo 3a, que representa 34% das infecções, deveria fazer parte do protocolo terapêutico, o que poderia reduzir o quadro de

esteatose hepática, normalmente associada, e conseqüentemente a melhora na eficácia do tratamento antiviral.

Os resultados deste trabalho deverão contribuir para o delineamento de novos estudos no sentido de melhorar a compreensão dos mecanismos inflamatórios hepáticos perivasculares observados em portadores crônicos do VHC, como única infecção ou em co-infecções com o HIV e VHB. Os eventos de sinalização celular decorrentes da estimulação dos receptores de LDL e ou VHC, nas células do endotélio vascular e hepatócitos, parecem também modular o processo inflamatório no estadiamento crônico da infecção. Neste sentido, em nosso laboratório outras pesquisas estão sendo realizadas para melhor compreensão dessas sinalizações e, possivelmente, favorecer o emprego de terapias adequadas à prevenção das lesões hepáticas severas e conseqüentes cirrose e insuficiência hepática.

## **CONCLUSÃO**

---

A infecção pelo VHC é clinicamente associada com significantes alterações nos níveis de lipoproteínas séricas quando comparadas com o perfil lipídico de indivíduos saudáveis. Nas análises realizadas foi possível observar alterações mais importantes nos níveis séricos de HDL, LDL e Apo B.

Observou-se um aumento, em média, de 25% nos níveis de LDL e 29% de apo B e correlação positiva entre a carga viral de pacientes portadores do genótipo 1b do VHC e apo B ( $r = 0,5763$ ). Frente aos resultados encontrados, é possível sugerir que o risco de pacientes portadores do VHC desenvolverem complicações vasculares é elevado, considerando que o aumento nos níveis de LDL e apo B está associado com o risco de desenvolvimento de doenças cardíacas.

Dessa forma, uma análise cuidadosa do perfil lipídico de pacientes acometidos de forma crônica pelo VHC deve fazer parte do protocolo terapêutico a fim de proporcionar maior eficácia no tratamento anti-viral contra a hepatite C.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

AGNELLO, V.; ABEL, G.; ELFAHAL, M.; KNIGHT, G. B.; ZHANG, X. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 12766–12771, 1999.

BALASUBRAMANIAN, A.; MUNSHI, N.; KOZIEL, M.J.; HU, Z.; LIANG, T.J.; GROOPMAN, J.E.; GANJU, R.K. Structural proteins of hepatitis C virus induce interleukin 8 production and apoptosis in human endothelial cells. **J. Gen. Virol.**, 86: 3291-3301, 2005.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN V. Replication of hepatitis C virus. **J. Gen. Virol.**, v. 81, p. 1631-1648, 2000.

BARTOSCH, B.; DUBUISSON, J.; COSSET, F.L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. **J. Exp. Med.**, v. 197, p. 633-642, 2003.

BEISIEGEL, U.; WEBER, W.; IHRKE, G.; HERZ, J.; STANLEY, K. K. The LDL - receptor - related protein, LRP, is an apolipoprotein E - binding protein. **Nature**, v. 341, p. 162-164, 1989.

BEISIEGEL, U. Lipoprotein metabolism. **Eur Heart J.**, v. 19, p. 20-23, 1998.

BEMBEN, D. A.; BEMBEN M. G. Effects of resistance exercise and body mass index on lipoprotein–lipid patterns of postmenopausal women. **J Strength Cond Res**, v. 14, p. 80-85, 2000.

BISCEGLIE, A.M.D. Hepatitis C – virology ad future antiviral targets. **Am. J. Med.**, v. 107, p. 45-48, 1999.

BLIGHT, K. & GOWANS, E. In situ hybridization and immunohistochemical staining of hepatitis C virus products. **Viral Hepatitis Reviews**, v. 1, p. 143-155, 1995.

BUKH, J.; MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. **Semin. Liver Dis.**, v. 15, p. 41-63, 1995a.

BUKH, J.; MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. Genetic heterogeneity of the hepatitis C virus. **Princess Takamatsu Symp.**, v. 25, p. 75-91, 1995b.



CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.R.; CARRILHO, F.J.; DA SILVA, L.C.; SOUTO, F.J.; SPINELLI, V.; PEREIRA, L.M.; COELHO, H.S.; SILVA, A.O.; FONSECA, J.C.; ROSA, H.; LACET, C.M.; BERNARDINI, A.P. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res.** v. 38, p. 41-49, 2005.

CHIANG, J. Y. Nuclear receptor regulation of lipid meta-bolism: potential therapeutics for dyslipidemia, diabetes, and chronic heart and liver diseases. **Curr Opin Investing Drugs**, v. 6, p. 994 – 1001, 2005.

CHOO, Q. L.; KUO, G., WEINER, A. J.; OVERBY, L. R.; BRADLEY, D. W. & HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a bloodborne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, p. 359-362, 1989.

CHOO, Q.L.; RICHMAN, K.H.; HAN, J.H.; BERGER, K.; LEE, C.; DONG, C.; GALLEGOS, C.; COIT, D.; MEDINA-SELBY, R.; BARR, P.J. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 2451-2455, 1991.

DÂMASO A. Nutrição e Exercício na Prevenção de Doenças. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

DATI, F.; LAMMERS, M.; ADAM, A.; SONDAG, D.; STIENEN L. Referenzwerte für 18 Plasmaproteine am Behring-Nephelometer-System. **Lab med.** Reference values are adapted to IFCC reference preparation SP3-07 by applying a conversion factor of 0.86, v. 13, p. 87-90,1989.

ENCKE, J.; PULTLITZ J.Z.; HEINTGES, T.; WANDS, J.R. Total chemical synthesis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus with long oligodeoxynucleotides. **J. Virol. Methods**, v. 74, p. 117-121, 1998.

ENOMOTO, N.; SAKUMA, I.; ASAHINA, Y.; KUROSAKI, M.; MURAKAMI, T.; YAMAMOTO, C.; OGURA, Y.; IZUMI, N.; MARUMO, F.; SATO, C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, p. 77-81, 1996.

FARCI, P.; SHIMODA, A.; WONG, D.; CABEZON, T.; GIOANNIS, D.; STRAZZERA, A.; SHIMIZU, Y.; SHAPIRO, M.; ALTER, H. J. & PURCELL, R. H. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 15394-15399, 1996.

FARCI, P.; SHIMODA, A.; COIANA, A.; DIAZ, G.; PEDDIS, G.; MELPOLDER, J.C.; STRAZZERA, A.; CHIEN, D.Y.; MUNOZ, S.J.; BALESTRIERI, A.; PURCELL, R.H.; ALTER, H.J. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. **Science**, v. 288, p. 339-344, 2001.

FERNANDEZ-RODRIGUEZ, CM.; LOPEZ-SERRANO, P.; ALONSO, S.; GUTIERREZ, ML, et al. Long-term reversal of hypocholes-terolaemia in patients with chronic hepatitis C is related to sustained viral response and viral genotype. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 24, p. 507 – 512, 2006.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Apolipoproteínas B e A-I: Fatores de risco cardiovascular? **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 53, p. 276-282, 2007.

FOURNIER, C.; SUREAU, C.; COSTE, J.; DUCOS, J.; PAGEAUX, G.; LARREY, D.; DOMERGUE, J. & MAUREL, P. In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. **J. Gen. Virol.**, v. 79, p. 2367-2374, 1998.

FRIEDWALD, W.T.; LEVY, R.; FREDRICKSON, D.S. Estimations of serum low density lipoprotein cholesterol without use of preparative ultracentrifuge. **Clin Chem.** v. 18, p. 499-502, 1972.

HERZ, J.; STRICKLAND, D. K. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. **J. Clin. Invest.**, v. 108, p. 779-84, 2001.

HOLLAND, P. V.; BARRERA, J. M.; ERCILLA, M. G.; YOSHIDA, C. F.; WANG, Y.; DE OLIM, G. A.; BETLACH, B.; KURAMOTO, K.; OKAMOTO, H. Genotyping hepatitis C virus isolates from Spain, Brazil, China and Macau by a simplified PCR method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 2372 – 2378.

HONDA, M.; PING, L. H.; RIJNBRAND, R. A.; AMPHLETT, E.; CLARKE, B.; ROWLANDS, D. & LEMON, S. M. Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. **Virology**, v. 222, p. 31-42, 1996.

HOUGHTON, M.; WEINER, A.; HAN, J.; KUO, G.; CHOO, Q-L. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. **Hepatology**, v. 14, p. 381-388, 1991.

JARMAY, K.; KARACSONY, G.; NAGY, A.; SCHAFF, Z. Changes in lipid metabolism in chronic hepatitis C. **World J Gas-troenterol**, v. 7, p. 6422 – 6428, 2005.

KATO, N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. **Microb. Comp. Genomics**, v. 5, p. 129-151, 2000.

KATO, N.; HIJIKATA, M.; OOTSUYAMA, Y.; NAKAGAWA, M.; OHKOSHI, S.; SUGIMURA, T.; SHIMOTOHNO, K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 9524-9528, 1990.

KRAUSS, R. M. Lipids and Lipoproteins in Patients with Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1496-1504, 2004.

LAI, M. M.; WARE, C.F. Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 242, p. 117-134, 2000.

LANDRO, J. A.; RAYBUCK, S. A.; LUONG, Y. P.; O'MALLEY, E. T.; HARBESON, S. L.; MORGENSTERN, K. A.; RAO, G.; LIVINGSTON, D. J. Mechanistic role of an NS4A peptide cofactor with the truncated NS3 protease of hepatitis C virus: elucidation of the NS4A stimulatory effect via kinetic analysis and inhibitor mapping. **Biochemistry**, v. 36, p. 9340-9348, 1997.

LEON, A. S.; SANCHEZ, O. A. Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention. **Med Sci Sports Exerc**, v. 33, p. 502 – 515, 2001.

LIANG, T. J.; REHERMAN, B.; SEEF, L. B.; HOOFNAGLE, J. H. Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C. **Ann. Intern. Med.**, v. 132, p. 296-3004, 2000.

MAEDA, M.F.Y.; SILVA, C.D.; HARIMA, L.S.; SILVA, L.F.F.; CTENAS, B.; ALVES, V.A.F. Vascularização na cirrose hepática: estudo imunoistoquímico baseado em necrópsias. **Arq. Gastroenterol.**, 45: 38-45, 2008.

MARTINS, R.M.B.; TELES, S.A.; FREITAS, N.R.; MOTTA-CASTRO, A.R.C.; SOUTO, F.J.D.; MUSSI, A.H. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from Mid-West region of Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 48, p. 1-3, 2006.

MCLAUCHLAN, J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. **J. Viral. Hepat.**, v. 7, p. 2-14, 2000.

MEUNIER, J. C.; ENGLE, R. E.; FAULK, K.; ZHAO, M.; BARTOSCH, B.; ALTER, H.; EMERSON, S. U.; COSSET, F. L.; PURCELL, R. H.; BUKH, J. Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 12, p. 4560 - 4565. 2005.

MILLER, J. P. Dyslipoproteinaemia of liver diseases. **Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.** v. 4, p. 807 – 832, 1990.

MOLINA, J. A.; HENG, B. H. Global trends in cardiology and cardiothoracic surgery: an opportunity or a threat? **Ann. Acad. Med. Singapore**. v. 38, p. 541-545, 2009.

NEUMANN, A. U.; LAM, N. P.; DAHARI, H.; GRETCH, D. R.; WILEY, T. E.; LAYDEN, T. J. & PERELSON, A. S. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. **Science**, v. 282, p. 103-107, 1998.

OKAMOTO, H.; MUNEKATA, E.; TSUDA, F.; TAKAHASHI, K.; YOTSUMOTO, S.; TANAKA, T.; TACHIBANA, K.; AKAHANE, Y.; SUGAI, Y.; MIYAKAWA, Y. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against the capsid protein of hepatitis C virus with a synthetic oligopeptide. **Jpn. J. Exp. Med.**, v. 60, p. 223-233, 1990.

OOIK; SHIRAKI, K.; SAKURAI, Y.; MORISHITA, Y.; NOBORI, T. Clinical significance of abnormal lipoprotein patterns in liver diseases. **Int. J. Mol. Med**. v. 15, p. 655-660, 2005.

PACKARD, C. J.; SHEPHERD, J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**. v. 17, p. 3542-3556, 1997.

PARANÁ, R.; VITVITSKY, L.; BERBY, F.; PORTUGAL, M.; COTRIM, H.P.; CAVALCANTE, A.; LYRA, L.; TREPÓ, C. HCV infection in Northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3a and absence of African genotypes. **Arq Gastroenterol**. v. 37, p. 213-216, 2000.

PILERI, P.; UEMATSU, Y.; CAMPAGNOLI, S.; GALLI, G.; FALUGI, F.; PETRACCA, R.; WEINER, A. J.; HOUGHTON, M.; ROSA, D.; GRANDI, G. & ABRIGNANI, S. Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science**, v. 282, p. 938-941, 1998.

PISCHON, T.; GIRMAN, C.J.; SACKS, F.M.; RIFAI, N.; STAMPFER, M.J.; RIMM, E.B. Non-high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in the prediction of coronary heart disease in men. **Circulation**, v. 112, p. 3375-3383, 2005.

RAMRATNAM, B.; BONHOEFFER, S.; BINLEY, J.; HURLEY, A.; ZHANG, L. Q.; MITTLER, J. E.; MARKOWITZ, M.; MOORE, J. P.; PERELSON, A. S. & HO, D. D. Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis. **Lancet**, v. 354, p. 1782-1785, 1999.

RIDKER, P.M.; RIFAI, N.; COOK, N.R.; BRADWIN, G.; BURING, J.E. Non-HDL Cholesterol, Apolipoproteins A-I and B100, Standard Lipid Measures, Lipid Ratios, and CRP as Risk Factors for Cardiovascular Disease in Women. **JAMA**. v. 294, p. 326-333, 2005.

RIFAI, N.; BACHORIK, P. S.; ALBERTS, J. J. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood ER (eds). Tietz - textbook of clinical chemistry. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; p. 809-61, 1999.

ROSA, D.; CAMPAGNOLI, S.; MORETTO, C.; GUENZI, E.; COUSENS, L.; CHIN, M.; DONG, C.; WEINER, A. J.; LAU, J. Y. N.; CHOO, Q. L.; CHIEN, D.; PILERI, P.; HOUGHTON, M. & ABRIGNANI, S. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 1759-1763, 1996.

ROSEMBERG, S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C. **J. Mol. Biol.**, v. 313, p. 451-464, 2001.

RUBBIA-BRANDT L.; LEANDRO G.; SPAHR L.; GIOSTRA E.; QUADRI R.; MALE P.J.; NEGRO F. Liver steatosis in chronic hepatitis C: a morphological sign suggesting infection with HCV genotype 3. **Histopathology**. v. 39, p. 119 – 124, 2001.

SEEFF, L. B. Natural history of chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, p. 35–46, 2002.

SIAGRIS, D.; CHRISTOFIDOU, M.; THEOCHARIS, G. J.; PAGONI, N.; PAPADIMITRIOU, C.; LEKKOU, A.; THOMOPOULOS, K.; STARAKIS, I.; TSAMANDAS, A. C.; LABROPOULOU-KARATZA, C. Serum lipid pattern in chronic hepatitis C: histological and virological correlations. **J Viral Hepat.** v. 13, p. 56-61, 2006.

SHIMOTOHNO, K. Hepatitis C virus as a causative agent of hepatocellular carcinoma. **Intervirolology**, v. 38, p. 162–169, 1995.

SIERVOGEL, R. M.; WISEMANDLE, W.; MAYNARD L. M.; GUO S. S.; ROCHE A. F.; CHUMLEA, W. C. Serial Changes in Body Composition Throughout Adulthood and Their Relationship to Changes in Lipid and Lipoprotein Levels. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 18, p. 1759 -1764, 1998.

SIMMONDS, P.; SMITH, D. B.; MCOMISH, F.; YAP, P. L.; KOLBERG, J.; URDEA, M. S.; HOLMES, E. C. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. **J. Gen. Virol.** v. 5, p. 1053 – 1061, 1994.

SOKAL, R.; R. and ROHLF, F. J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. 3rd edition. W. H. Freeman and Co.: New York. 887 pp, 1995.

STADHOUDERS, P. H. G. M.; COOREMAN, M. P. Chronic hepatitis C virus disease: an evaluation of procedures for diagnosis and treatment. **Neth. J. Med.**, v. 51, p. 213-224, 1997.

STUMPF, M. P. H.; PYBUS, O. G. Genetic diversity and models of viral evolution for the hepatitis C virus. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 214, p. 143-152, 2002.

TALMUD P.J.; HAWE, E.; MILLER, G.J.; HUMPHRIES, S.E. Nonfasting apolipoprotein B and triglyceride levels as a useful predictor of coronary heart disease risk in middle-aged UK men. **Arterioscler Thromb. Vasc. Biology**. v. 22, p. 1918-1923, 2002.

TANJI, Y.; KANEKO, T.; SATOH, S.; SHIMOTOHNO K. Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. **J. Virol.**, v. 69, p. 3980-3986, 1995.

TAYLOR, D. R.; SHI, S. T.; LAI, M. M. Hepatitis C virus and interferon resistance. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1743-1756, 2000.

THOMSON, M. and T. J. LIANG. Molecular biology of hepatitis C virus. *In* T. J. Liang, and J. H. Hoofnagle (ed.), Hepatitis C. **Biomedical Research Reports**. p. 1-23, 2000.

THOMSEN, R.; BONK, S.; PROPFE, C.; HEERMANN, K. H.; KÖCHEL, H. G. & UY, A. Association of hepatitis C virus in human sera with betalipoprotein. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 181, p. 293-300, 1992.

WALLDIUS, G.; JUNGNER, I.; HOLME, I.; AASTVEIT, A.H.; KOLAR, W.; STEINER, E. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. **Lancet.**, v. 358, p. 2026-2033, 2001.

WALLDIUS, G.; JUNGNER, I. Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy. **J Intern Med.**, v. 255, p. 188-205, 2004.

WALLDIUS, G.; JUNGNER, I. The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy – a review of the evidence. **J Intern Med.**, v. 259, p. 493-519, 2006.

WECK, K. Molecular methods of hepatitis C genotyping. **Expert Rev. Mol. Diagn.**, v. 5, p. 507 – 520, 2005.

WHO. World Health Organization. **Hepatitis C**. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/>>. Acesso em 20 de maio de 2009.

WILLIAMS, P. T. High-Density Lipoprotein Cholesterol and Other Risk Factors For Coronary Heart Disease in Female Runners. **N Engl J Med**, v. 334, p. 1298-1303, 1996.

ZEUZEM, S.; SCHMIDT, J. M.; LEE, J. H.; VON WAGNER, M.; TEUBER, G. & ROTH, W. K. Hepatitis C virus dynamics in vivo: effect of ribavirin and interferon alfa on viral turnover. **Hepatology**, v. 28, p. 245-252, 1998.

ZIBERT, A.; SCHREIER, E. & ROGGENDORF, M. Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. **Virology**, v. 208, p. 653-661, 1995.

# ***ANEXOS***

---



**TERMO DE DOAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO**

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG \_\_\_\_\_, nacionalidade \_\_\_\_\_, maior e  
responsável, estado civil \_\_\_\_\_, profissão \_\_\_\_\_,  
residente \_\_\_\_\_, cidade \_\_\_\_\_,  
estado \_\_\_\_\_, no pleno gozo de minhas faculdades mentais e de minha livre e  
espontânea vontade autorizo Camila Tita Nogueira a retirar amostra de 10ml de meu  
sangue, a qual será doada e utilizada na pesquisa “Estudo da Influência do Vírus da  
Hepatite C sobre o Metabolismo Lipídico em Hepatopatas Crônicos”, sob a  
responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa.

Araraquara, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu \_\_\_\_\_,  
RG \_\_\_\_\_, Estado Civil \_\_\_\_\_, Idade \_\_\_\_ anos,  
residente na \_\_\_\_\_, nº \_\_\_\_\_,  
Bairro \_\_\_\_\_, Cidade \_\_\_\_\_, Tel  
efone \_\_\_\_\_,

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade estudar os efeitos do vírus da Hepatite C sobre o metabolismo lipídico de pacientes crônicos portadores da infecção;
2. Ao participar desse trabalho, estarei contribuindo para melhor entendimento dos mecanismos de ação do vírus da Hepatite C sobre o organismo humano e os resultados obtidos serão revertidos em benefício da população;
3. Doarei para a realização dessa pesquisa, o seguinte material biológico:
  - Na condição de DOADOR DE SANGUE do Hemonúcleo Regional de Araraquara-CACH/NAC/FCF-UNESP: uma amostra de sangue para ser avaliada como controle do perfil lipídico;
  - Na condição de USUÁRIO da Rede de Laboratórios de Hepatites Virais: uma amostra para avaliação do perfil lipídico relacionado à infecção viral.O material biológico doado deverá ser utilizado exclusivamente para essa pesquisa, não podendo ser reutilizado em pesquisas posteriores;
4. A minha participação como voluntário terá a duração de um dia, ocorrendo apenas no momento da coleta da amostra biológica, não sendo necessário o retorno ao Laboratório ou Hemonúcleo para nova coleta;
5. Ao participar dessa pesquisa, não estarei exposto a nenhum desconforto ou risco adicional, uma vez que as amostras de sangue fazem parte de uma rotina no laboratório da Instituição (FCF/Unesp).
6. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;

7. Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos físicos ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por esse trabalho ou da Instituição (FCF/Unesp);
8. Meu nome será mantido em **sigilo**, assegurando assim minha **privacidade** e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;
9. Estou ciente de que o material a ser doado será utilizado **exclusivamente** nesta pesquisa, não podendo ser armazenado para uso posterior sem o meu consentimento;
10. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização, isto é, sem interrupção do meu tratamento;
11. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimento poderei entrar em contato com a equipe científica do projeto pelo telefone: (0XX16) 3301-6100 ou 3301 6549 das 8:00 e 18:00 horas de segunda à sexta-feira – Camila Tita Nogueira.
12. Para notificação de qualquer situação relacionada com a ética que não puder ser resolvida pelos pesquisadores, deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (0XX16) 3301 6897.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar como voluntário (a) do projeto “Estudo da Influência do Vírus da Hepatite C sobre o Metabolismo Lipídico em Hepatopatas Crônicos”.

Araraquara, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

---

Assinatura do Voluntário

---

Assinatura do Pesquisador