



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Beatriz de Jesus Brait

**Polimorfismos Genéticos Relacionados à Via da
Vitamina D em Pacientes com Cirrose com ou
sem Carcinoma Hepatocelular**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

São José do Rio Preto

2019

Beatriz de Jesus Brait

**Polimorfismos Genéticos Relacionados à Via da
Vitamina D em Pacientes com Cirrose com ou
sem Carcinoma Hepatocelular**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo
Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza
Coorientadora: Profa. Dra. Rita de Cassia Martins Alves Silva

São José do Rio Preto
2019

Brait, Beatriz de Jesus

Polimorfismos Genéticos Relacionados à Via da Vitamina D em Pacientes com Cirrose com ou sem Carcinoma Hepatocelular

São José do Rio Preto, 2019

102 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

Coorientadora: Profa. Dra. Rita de Cassia Martins Alves Silva

1. Fígado; 2. Polimorfismo de nucleotídeo único; 3. Neoplasias; 4. Vitamina D.

Beatriz de Jesus Brait

**Polimorfismos Genéticos Relacionados à Via da
Vitamina D em Pacientes com Cirrose com ou
sem Carcinoma Hepatocelular**

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Profa Dra Dorotéia Rossi da Silva Souza

2º Examinador: Profa Dra Ana Elizabete Silva

3º Examinador: Prof Dr William José Duca

Suplentes:

São José do Rio Preto, 26/06/2019.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS	iii
AGRADECIMENTOS	vi
EPÍGRAFE.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE QUADROS.....	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xvi
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos Epidemiológicos	1
1.2 Vitamina D	3
1.3 Variantes Genéticas.....	8
1.4 Objetivos	12
1.5 Objetivos Específicos.....	12
2. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	14
2.1 Casuística	14
2.2 Métodos.....	15
2.2.1 Extração de DNA	16
2.2.2 Genotipagem por reação em cadeia da polimerase-PCR em tempo real	16
2.2.3 Perfil demográfico, clínico, bioquímico e hábitos de vida.....	17
2.2.4 Análise estatística.....	18
3. RESULTADOS	21
3.1 Perfil Clínico-Demográfico e Hábitos de Vida.....	21
3.2 Perfil Genético	21
3.3 Hardy-Weinberg.....	27
3.4 Desequilíbrio de Ligação e Haplótipos de <i>DBP</i>	27
3.5 Perfil Bioquímico	28
3.6 Vitamina D e PTH.....	33

3.7 Fatores Independentes	38
3.8 Análise de Sobrevida.....	39
4. DISCUSSÃO.....	45
5. CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
APÊNDICE I.....	71
APÊNDICE II - Artigo	73
ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética	97
ANEXO II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	98
ANEXO III – Extração de DNA	100
ANEXO IV - Questionário	102

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Ao meu porto seguro, que também chamo de família. Minha mãe Suely e meu pai Pedro, que sempre me apoiaram e incentivaram nos meus objetivos. Meu irmão Pedro Otavio e minha avó Benedita, que acompanharam de perto a minha trajetória. Minha afilhada Lis, e meu irmão de coração Guilherme, por me arrancarem vários sorrisos. Aos tios-avôs Valentim e Maria Helena, por cuidarem de mim, todo esse tempo como uma filha/neta. E à minha Orientadora, que considero uma mãe. Agradeço todo apoio e por acreditarem no meu crescimento. Sem vocês não teria a mesma motivação. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Sempre a Deus, por mostrar a esta filha, as maravilhas da vida, as oportunidades e as pessoas preciosas que me acompanham e também por dar a força para enfrentar os obstáculos do crescimento pessoal.

A todos os meus parentes (Família de Jesus e Família Brait), que sempre me apoiaram, incentivaram na carreira acadêmica e desejaram boas vibrações. Obrigada por entenderem as minhas ausências e pelos momentos de descontração. Amo vocês!

À minha amada Família NPBM, pelo acolhimento ainda na época do estágio da faculdade e por terem me ensinado tudo sobre laboratório, não negarem ajuda sempre que precisei, mas principalmente os valores pessoais, de vida e convivência. Se eu cheguei até aqui, saibam que cada um participou dessa conquista junto comigo. Sou muito grata a todos vocês por todos esses anos de ensino e amizades, e pelos anos que virão também. São todos especiais para mim!

À Profa. Dra. Rita por aceitar ser minha coorientadora, por proporcionar a oportunidade de fazer o tão desejado mestrado com seu projeto, por sanar as minhas dúvidas, acrescentar seus valiosos conhecimentos à nossa pesquisa e por acreditar que eu era capaz. Muito obrigada!

Agradeço aos alunos que fizeram iniciação científica conosco (Augusto, Letícia, Natália e Octávio), por se interessarem no assunto, cumprirem seus deveres, compartilhar seus conhecimentos e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Moacir Fernandes Godoy, por não cansar em explicar inúmeras vezes como funcionavam os testes estatísticos, por sempre estar à disposição em ajudar e pelas brincadeiras.

Ao pessoal dos laboratórios vizinhos, principalmente à UPGEM, LITEX, Multiusuário, Microbiologia e LMMB (Bioinformática da Prof^a Tajara) por nos ajudar com dúvidas, ensinar técnicas, emprestar equipamentos, socorrer nos momentos de desespero e sempre serem cordiais e simpáticos.

Aos meus amigos que participaram da minha caminhada. À amiga irmã, Natália Aguiar, pelos 14 anos de amizade e por todo o apoio e crença em mim. Aos queridos, Letícia Barela, Augusto, Fernando, Juliana, Letícia e Thaís, por manterem a amizade mesmo após o término da faculdade, pelo apoio e também por acreditarem em mim. Orgulho-me de vocês!

Agradeço imensamente às minhas irmãs que a vida me deu e pude conviver diariamente durante meus anos de estudos, morando na república que apelidamos de Ohana. Porque Ohana quer dizer família, e família quer dizer nunca abandonar ou esquecer. Obrigada por todos esses anos de amizades, brincadeiras e por estarem ao meu lado me apoiando: Carmem Salviato, adoradora de gatinhos; Beatriz D'Alkmin, a minha xará preferida; e Maria Clara Zago, a bixete fofinha.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos Sara, Samara (Samy), Luiz Felipe (Blue), Rodrigo (Lee), Luan (Sax), Charles (Rasari), Oséias (Kuro), Victor (Fox), Victor (Majim), Daniel (Ney), Gabrielle (Army), Gabrielle (Bad Girl), Ana Beatriz (Laly), Rafael (Rafa), William (Will), Ricardo (Red), Thamires (Thamy), Diogo Gabriel (Who 42), Gravata Borboleta, Lord, Lugaid, por estarem ao meu lado nos momentos de descontração, entenderem meus momentos de ausência e pouca conversa. Obrigada por me apoiarem e participarem da minha vida, mesmo estando distantes.

Ao grupo GOT7 por sempre amarem seus fãs e quererem nosso bem. Vocês me fizeram feliz todos esses anos. Suas músicas me ajudaram na concentração enquanto escrevia este trabalho.

Aos pacientes e voluntários que aceitaram participar desta pesquisa.

Ao pessoal da pós-graduação por tirarem todas as minhas dúvidas e por serem sempre tão simpáticos.

A todos os profissionais do sistema FUNFARME/HB que participaram de alguma forma da nossa pesquisa. Em especial, as funcionárias do oitavo andar do Hospital de Base: secretária Angela e enfermeira Helen.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro na execução deste trabalho (Processo: 2015/04338-1).

E, por fim, mas não menos importante, agradeço imensamente a você, que está lendo. Espero que este trabalho ajude no que está procurando e dê continuidade a várias outras pesquisas.

EPÍGRAFE

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas, o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das fórmulas esteroquímicas da via metabólica da vitamina D.	4
Figura 2. Representação da via metabólica da vitamina D.	5
Figura 3. Representação da via metabólica da via da vitamina D	10
Figura 4. Representação de box plot de vitamina D e paratormônio.	34
Figura 5. Representação de correlação de vitamina D e paratormônio.	37
Figura 6. Curva atuarial de Kaplan-Meier, considerando polimorfismo <i>DBP</i> -rs7041.	41
Figura 7. Curva atuarial de Kaplan-Meier, considerando polimorfismo <i>DBP</i> -rs4588.	42
Figura 8. Curva atuarial de Kaplan-Meier, considerando polimorfismo <i>CYP24A1</i> -rs6013897.	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Especificações para os polimorfismos da proteína transportadora da vitamina D (DBP) e do citocromo P450 família 24 subfamília A membro 1 (CYP24A1) analisados com os ensaios TaqMan® SNP Genotyping.	17
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil demográfico, hábitos de vida e comorbidades no grupo total de pacientes (GTotal), em pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular (G1) e com cirrose isolada (G2), e indivíduos sem a doença (G3).	23
Tabela 2. Frequências alélicas e genótípicas para o polimorfismo <i>DBP</i> -rs4588 no grupo total de pacientes (GTotal), em pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular (G1), pacientes com cirrose isolada (G2) e indivíduos sem a doença (G3).	24
Tabela 3. Frequências alélicas e genótípicas para o polimorfismo <i>DBP</i> -rs7041 no grupo total de pacientes (GTotal), em pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular (G1), pacientes com cirrose isolada (G2) e indivíduos sem a doença (G3).	25
Tabela 4. Frequências alélicas e genótípicas para o polimorfismo <i>CYP24A1</i> - rs6013897 no grupo total de pacientes (GTotal), em pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular (G1), pacientes com cirrose isolada (G2) e indivíduos sem a doença (G3).	26
Tabela 5. Distribuição genotípica observada (H_o) e esperada (H_e) para os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) de <i>DBP</i> (<i>Vitamin D-binding protein</i>) e <i>CYP24A1</i> (<i>Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1</i>) com os respectivos valores de P para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), em pacientes com cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular e indivíduos sem hepatopatias (controle).	27
Tabela 6. Haplótipos dos genótipos para <i>DBP</i> em pacientes com cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular e indivíduos sem a doença (controles).	28
Tabela 7. Valores de mediana, mínimo e máximo para perfil bioquímico no grupo total de pacientes (GTotal), pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular (G1) e com cirrose isolada (G2), de acordo com o sexo.	29
Tabela 8. Perfil bioquímico alterado no grupo total de pacientes (GTotal), em pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular (G1) e cirrose isolada (G2), de acordo com o sexo.	32
Tabela 9. Distribuição de valores alterados e recomendados de vitamina D e paratormônio em subgrupo de pacientes (GTd) com cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular (CHC), com cirrose e CHC (G1d) e com cirrose isolada (G2d), e indivíduos sem hepatopatias (G3d).	35
Tabela 10. Distribuição de pacientes com cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular e controles, considerando níveis plasmáticos alterados e recomendados de vitamina D e polimorfismos genéticos de <i>DBP</i> (<i>Vitamin D-binding protein</i>) e <i>CYP24A1</i> (<i>Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1</i>).	36
Tabela 11. Perfil de risco por análise de regressão logística em grupo total de pacientes (GTotal = cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular – CHC), pacientes com cirrose e CHC (G1), com cirrose isolada (G2) comparado a indivíduos saudáveis e subgrupo com indivíduos com dosagem de vitamina D.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
/	Por
<	Menor
≤	Menor ou igual
>	Maior
≥	Maior ou igual
μL	Microlitro
AASLD	<i>American Association for the Study of Liver Diseases</i> = Associação Americana para o Estudo de Doenças do Fígado
ABS	Absoluta
AFP	Alfafetoproteína
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHC	Carcinoma hepatocelular
CYP24A1	<i>Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1</i> = Citocromo P450 da família 24, subfamília A, membro 1
DBP	<i>Vitamin D binding protein</i> = Proteína transportadora de vitamina D
Depc	Dietil pirocarbonato
DL	Desequilíbrio de ligação
DM	Diabetes mellitus
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> = Ácido desoxirribonucléico
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Freq.	Frequência
g	Gramas
GTotal	Grupo total de estudo
GGT	Gama glutamil transferase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HBV	<i>Hepatitis B virus</i> = Vírus da hepatite B

HCV	<i>Hepatitis C virus</i> = Vírus da hepatite C
HB/FAMERP	Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
HWE	<i>Hardy–Weinberg equilibrium</i> = Equilíbrio de Hardy-Weinberg
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MELD	<i>Model for end-stage liver disease</i> = Modelo para estadiamento da doença hepática
Mg/mL	Miligrama por mililitro
Min	Minuto
mL	Mililitro
N	Número de indivíduos
NAFLD	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i> = Doença hepática gordurosa não alcoólica
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> = Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
ng	Nanograma
OR	<i>Odds ratio</i> = Razão de chances
°C	Grau Celsius
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> = Reação em cadeia da polimerase
Pi	Fosfato inorgânico
PTH	Paratormônio
S	Segundo
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> = Polimorfismo de nucleotídeo único
χ^2	Teste Qui-quadrado

RESUMO

Introdução - Cirrose, doença hepática caracterizada por fibrose, pode evoluir para carcinoma hepatocelular (CHC). Deficiência de vitamina D tem sido relacionada à gravidade de doenças hepáticas crônicas. Ressalta-se o envolvimento de fatores genéticos no transporte e metabolismo da vitamina D, o que deve ser esclarecido na cirrose e CHC. **Objetivo** - Avaliar a associação de polimorfismos genéticos da proteína transportadora da vitamina D (*DBP*-rs4588 e *DBP*-rs7041) e citocromo P450 família 24 subfamília A membro 1 (*CYP24A1*-rs6013897), em pacientes com cirrose com ou sem CHC, considerando perfil clínico-demográfico, nível sérico de vitamina D e sobrevida.

Casuística e Métodos - Foram estudados 383 indivíduos, incluindo Grupo Total de pacientes (GTotal: N=158) com cirrose com ou sem CHC, distribuídos em Grupo 1 (G1): 60 com cirrose e CHC e Grupo 2 (G2): 98 com cirrose, e grupo controle sem hepatopatias (G3: N=225). Polimorfismos genéticos foram analisados por PCR em tempo real. Perfil clínico-demográfico e hábitos de vida foram obtidos por questionário e prontuário médico. Admitiu-se erro α de 5%. **Resultados** – Sexo masculino destacou-se em todos os grupos. Para *DBP*-rs4588 prevaleceu o genótipo homozigoto selvagem (C/C), particularmente nas mulheres em G3 (56,1%; G1=20%; P=0,0440). Ainda, para este polimorfismo, em G1, prevaleceram genótipos com pelo menos um alelo polimórfico ($_ / A$: 80%; G3=43,9%; P=0,0440), assim como alelo A (G1=0,50; G2=0,21; P=0,0346). A frequência do polimorfismo *DBP*-rs7041 foi semelhante nos grupos (P>0,05). Para *CYP24A1*-rs6013897, predominou o genótipo homozigoto selvagem (A/A) em G2 (11,2%) versus G1 (1,7%; P=0,0309), em cujos pacientes destacaram-se também genótipos com pelo menos um alelo polimórfico ($_ / T$: G1=98,3%; G2=88,8%; P=0,0309). Desequilíbrio de ligação mostrou associação alélica

entre os pares *DBP*-rs4588-*DBP*-rs7041 em pacientes e controles ($P=0,00000$). O haplótipo CG destacou-se em pacientes (45,9%) e controles (51,3%), seguido de AT e CT ($P>0,05$). Subgrupos de pacientes e controles mostraram semelhança para níveis séricos de vitamina D e paratormônio (PTH) ($P>0,05$). Genótipos de *DBP*-rs4588 com pelo menos um alelo polimórfico ($_ / A$) associaram-se a níveis reduzidos de vitamina D em pacientes (77,8%; controles: 14,3%; $P=0,0406$), e aumentados de vitamina D nos controles (76,9%) comparado ao genótipo selvagem (C/C: 23,1%; $P=0,0166$). Houve correlação positiva moderada entre vitamina D e PTH apenas no GTTotal ($R^2= 0,3273$). Destacaram-se como fatores independentes para cirrose tabagismo, etilismo e diabetes mellitus (DM), assim como para cirrose com CHC, exceto o tabagismo, acrescentando-se também, avanço da idade, sexo masculino, alelo polimórfico de *CYP24A1*-rs6013897 ($_ / T$), hepatites virais e níveis séricos alterados de gama glutamil transpeptidase (GGT), alfa fetoproteína (AFP) e creatinina. Observou-se acréscimo de sobrevida no GTTotal na presença do alelo polimórfico de *DBP*-rs7041, entretanto, com significância ($P=0,0282$) apenas no grupo geral (com ou sem transplante). **Conclusão** – Polimorfismos *DBP*-rs4588 (em mulheres) e *CYP24A1*-rs6013897 associam-se com cirrose e CHC, confirmam-se também como possíveis preditores etilismo, DM, avanço de idade, *CYP24A1*-rs6013897, níveis elevados de GGT, AFP, creatinina e hepatites virais; enquanto tabagismo, etilismo e DM para cirrose isolada. Polimorfismo *DBP*-rs4588 associa-se com níveis reduzidos de vitamina D em pacientes e aumentados nos controles, enquanto *DBP*-rs7041 confere acréscimo de sobrevida em pacientes com cirrose com ou sem CHC.

Palavras-Chave: Fígado, Polimorfismo de nucleotídeo único, Neoplasia, Vitamina D.

ABSTRACT

Introduction – Cirrhosis, liver disease characterized by fibrosis, may progress to hepatocellular carcinoma (HCC). Vitamin D deficiency has been linked to the severity of chronic liver disease. It is also worth mentioning the involvement of genetic factors in the transport and metabolism of vitamin D, which should be clarified in cirrhosis and HCC. **Objective** - To evaluate the association of genetic polymorphisms of the vitamin D binding protein (*DBP*-rs4588 and *DBP*-rs7041) and the cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1 (*CYP24A1*-rs6013897), in patients with cirrhosis with or without CHC, considering profile clinical-demographic, serum vitamin D and survival. **Casuistic and Methods** - We studied 383 subjects, including Group Total patients (GTotal: N=158) with cirrhosis with or without CHC, distributed in Group 1 (G1): 60 with cirrhosis and CHC and Group 2 (G2): 98 with cirrhosis, and the control group without hepatopathies (G3: N=225). Genetic polymorphisms were analyzed by real-time PCR. Clinical-demographic profile and life habits were obtained by questionnaire and medical record. A 5% error was accepted. **Results** – Male gender was highlighted in all groups. For *DBP*-rs4588, the wild homozygous genotype (C/C) prevailed in the groups, particularly in woman G3 (56.1%; G1=20%; P=0.0440). Also, for this polymorphism, in G1, genotypes with at least one polymorphic allele (C/A: 80%; G3=43.9%, P=0.0440), as well as allele A (G1=0.50 versus G2=0.21, P=0.0346). The frequency of *DBP*-rs7041 polymorphism was similar in the groups (P>0.05). For *CYP24A1*-rs6013897, the wild-type homozygous (A/A) genotype predominated in G2 (11.2%; G1=1.7%; P=0.0309), in which patients genotypes highlight with at least one allele polymorphic (A/T: G1=98.3%; G2=88.8%, P=0.0309). Linkage disequilibrium showed allelic association between *DBP*-rs4588-*DBP*-rs7041 pairs in patients and

controls ($P=0.00000$). CG haplotype was observed in patients (45.9%) and controls (51.3%), followed by AT and CT ($P>0.05$). Subgroups of patients and controls showed similarity to serum levels of vitamin D and parathyroid hormone (PTH) ($P>0.05$). Genotypes of *DBP*-rs4588 with at least one polymorphic allele ($_ / A$) were associated with reduced levels of vitamin D in patients (77.8%; controls=14.3%, $P=0.0406$), and increased vitamin D in controls (76.9%) compared to the wild-type genotype (C/C: 23.1%, $P=0.0166$). There was a moderate positive correlation between vitamin D and PTH only in GTotal ($R^2=0.3273$). Highlight as cirrhosis independent factors smoking, alcoholism and diabetes mellitus (DM), as well as for cirrhosis with CHC, except smoking, also adding age advancement, male gender, polymorphic allele of *CYP24A1*-rs6013897 ($_ / T$), viral hepatitis and altered serum levels of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), alpha-fetoprotein (AFP) and creatinine. Survival increase in GTotal was observed in the presence of the polymorphic allele of *DBP*-rs7041, however, with significance ($P=0.0282$) only in the general group (with or without transplantation). **Conclusion** - *DBP*-rs4588 (in women) and *CYP24A1*-rs6013897 polymorphisms are associated with cirrhosis and CHC, also confirm possible predictors of alcoholism, DM, advanced age, *CYP24A1*-rs6013897, increased level of GGT, AFP, creatinine and viral hepatitis; while smoking, alcoholism and DM for isolated cirrhosis. *DBP*-rs4588 polymorphism is associated with reduced levels of vitamin D in patients and increased in controls, whereas *DBP*-rs7041 confers increase survival in patients with cirrhosis with or without CHC.

Keywords: Liver, Single nucleotide polymorphism, Neoplasia, Vitamin D.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Epidemiológicos

Cirrose é uma doença hepática crônica irreversível que se caracteriza por fibrose, várias lesões estruturais hepáticas¹ e formação de nódulos regenerativos²⁻⁴. Cerca de 633 mil pacientes com doenças crônicas desenvolvem cirrose por ano, correspondente a prevalência mundial de 4,5% a 9%⁵. Representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade⁶, no entanto, sua prevalência é subestimada, pois muitos pacientes permanecem assintomáticos⁵.

De acordo com o *Institute for Health Metrics and Evaluation* (IHME) da Universidade de Washington, em 2017, a cirrose e outras doenças crônicas do fígado destacaram-se como a décima causa de morte no mundo (2,36% do total de mortes). Nessa avaliação, a doença ocupa a nona causa de morte no Brasil (2,69% do total de mortes) e a sétima causa no Estado de São Paulo (2,93% do total de mortes)⁷.

Ressalta-se que a cirrose está diretamente associada ao desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (CHC)^{1,6,8}, presente em 90% dos casos desse tipo tumoral⁹⁻¹¹. O CHC, tumor maligno encapsulado e bem vascularizado, representa a principal neoplasia primária do fígado^{12,13} com alta taxa de mortalidade¹⁴, sendo a terceira causa mais comum de morte relacionado ao câncer no mundo, com 692 mil casos por ano. A incidência mundial de CHC é crescente, com 500 mil casos ao ano, isso decorre da alta prevalência das hepatites B e C, particularmente na Ásia e África⁵.

Nesse contexto, o diagnóstico precoce e a identificação de pacientes de alto-risco são favoráveis para a prevenção e tratamento⁸. Técnicas de imagem são utilizadas para o diagnóstico de CHC e cirrose, entretanto, a confirmação da doença é realizada por exame anátomo patológico¹⁰. Em relação ao tratamento, é efetivo nos estágios iniciais

da doença. Destacando-se terapia ablativa local, ressecção ou transplante hepático que é o mais efetivo para CHC ou cirrose moderada e grave¹⁵, com a remoção de tumores identificados ou não pelo exame de imagem¹⁶.

Os principais fatores de risco para cirrose e CHC incluem hábito etilista, hepatites virais B e C, tabagismo e doenças metabólicas^{1,2,4,8,10}. O consumo de 80g/dL ou mais de álcool diário por mais de 10 anos, amplia a chance de adquirir cirrose e CHC, pois aumenta o estresse oxidativo, causa alterações crônicas no fígado e no metabolismo e provoca inflamação¹⁶. No Brasil, em 2016, 69,5% e 42,6% da cirrose em homens e mulheres, respectivamente, associou-se ao consumo abusivo de álcool¹⁷. Ressalta-se que a progressão da doença no estágio de fibrose para cirrose pode ocorrer em um intervalo de 15 a 20 anos, considerando os fatores de risco associados. As complicações mais frequentes são ascite, icterícia, encefalopatia, síndrome hepatorenal e má nutrição⁴. Ressalta-se que o consumo do álcool associa-se fortemente ao tabagismo¹⁷, conferindo maior risco para CHC^{10,11}, principalmente na presença de hepatites virais B e C^{9,16}. Acrescenta-se, ainda, que ambos os hábitos em conjunto estão relacionados à pior prognóstico da doença¹⁷.

A identificação de biomarcadores pode contribuir no esclarecimento da fisiopatologia relacionada ao desenvolvimento do câncer⁸, destacando cirrose por qualquer etiologia assim como fatores genéticos e ambientais⁴. Reconhecidamente, eventos biomoleculares que desencadeiam a carcinogênese hepática podem resultar de alterações que interferem na síntese de ácido desoxirribunucleico (DNA) como a cirrose e infecção viral (VHB e VHC)¹⁸. Além disso, ressalta-se o papel da vitamina D, reconhecida por manter a homeostase do cálcio, imunomodulação e pelo poder inibitório no câncer¹⁹. Acrescenta-se, ainda, sua participação como modulador da

proliferação celular. Desse modo, a vitamina D vem sendo alvo de diversos estudos, devido aos seus benefícios à saúde e a possível prevenção de doenças crônicas, como o câncer²⁰.

1.2 Vitamina D

A vitamina D pertence à superfamília dos hormônios secosteróides, é lipossolúvel e se subdivide em vitamina D₂ (origem vegetal), denominada ergocalciferol, e vitamina D₃ ou colecalciferol (origem animal). Ambos os tipos diferem pela presença de um átomo de carbono a mais na estrutura de D₂ (28C), além de um grupo metil extra no carbono 24 e uma ligação dupla adicional entre os carbonos 22 e 23 (Figura 1). Considerando-se a quantidade de vitamina D necessária à adequada função do organismo, 10% a 20% provêm da dieta, e 80% a 90% são sintetizados endogenamente²¹.

Portanto, a vitamina D pode ser adquirida de duas formas: a) ingestão de alimentos (D₂ e D₃), processo pelo qual a vitamina D é absorvida no intestino e/ou camadas basais epidérmicas; e, b) exposição aos raios ultra-violeta B (UVB), age na pró-vitamina D₃ (7-deidrocalciferol) convertendo em pré-vitamina D₃, iniciando a síntese da vitamina D₃ pela pele (Figuras 1 e 2). A vitamina D (D₂ e D₃) liga-se à proteína transportadora da vitamina D (DBP) para ser levada ao fígado. Então, é hidroxilada pela 25-hidroxilase (25-OHase) em 25(OH)D [25(OH)D₂ – origem vegetal e 25(OH)D₃ – animal), denominada 25-hidroxivitamina D, 25-hidroxicolecalciferol ou calcidiol, cujo transporte para os rins é realizado pela sua ligação com DBP, onde será transformada na forma ativa 1,25-dihidroxivitamina D [1 α ,25(OH)₂D] (calcitriol) pela 1 α -hidroxilase (1 α -OHase). Ressalta-se que a maioria de 25(OH)D e 1,25(OH)₂D está ligada a DBP, aproximadamente 10–15% à albumina e livres representam apenas menos

de 1% das moléculas²².

A degradação de 25(OH)D e da sua forma ativa é realizada pela enzima 24-OHase, codificada pelo gene do citocromo P450 da família 24, subfamília A, membro 1 (CYP24A1), sendo excretados em seguida^{23,24,25,26} (Figuras 2). A síntese da forma ativa a partir de 25(OH)D é estimulada pelo hormônio da paratireóide (paratormônio-PTH) e suprimida por cálcio (Ca^{2+}), íons fosfato livres (Pi) e pelo próprio 25(OH)D. Já a regulação do CYP24A1 é mediada pela 1,25(OH)₂D, sendo que a regulação positiva pode prevenir acúmulo de níveis tóxicos de 1,25(OH)₂D e 25(OH)D, e a regulação negativa pode prolongar a meia-vida de 25(OH)D quando há pouca vitamina D²⁷.

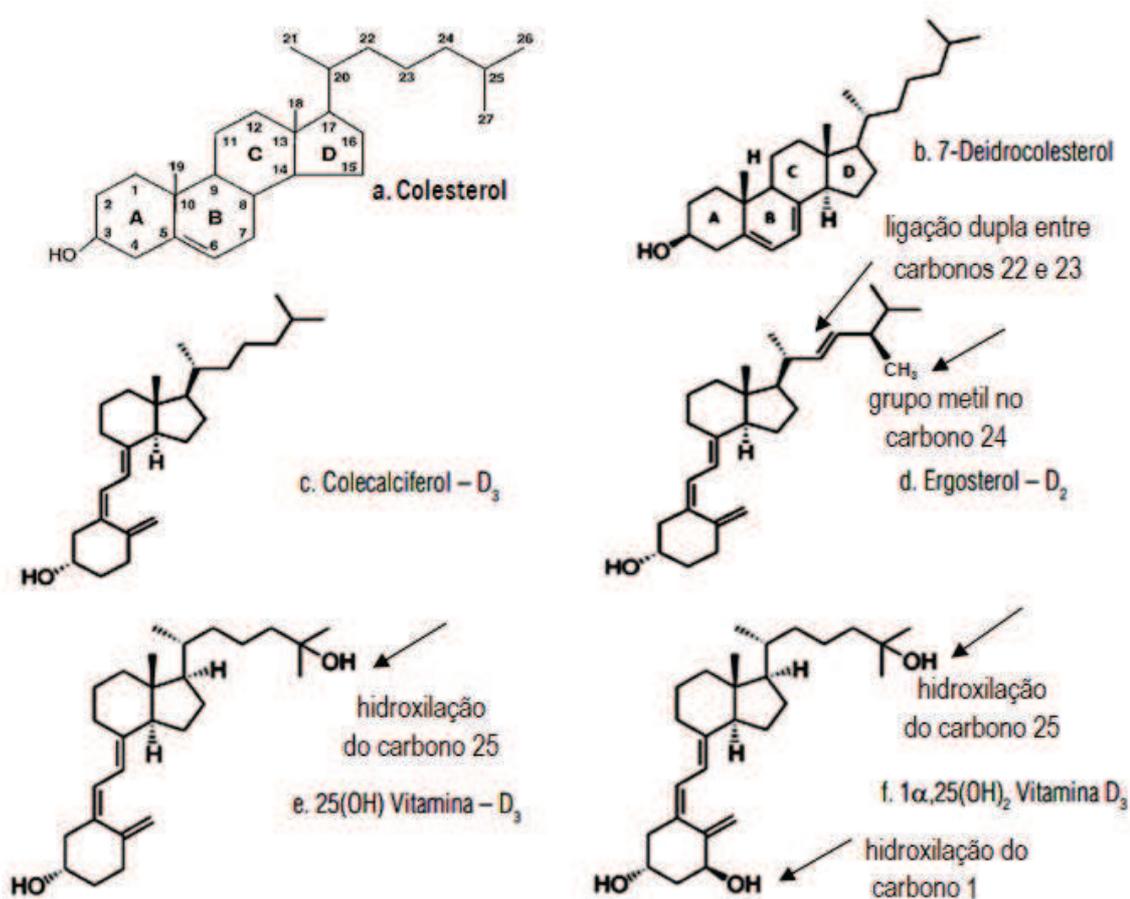


Figura 1. Representação das fórmulas esteroquímicas da via metabólica da vitamina D. O colesterol (a) é apresentado como referência para a respectiva numeração dos átomos de carbono. O 7-deidrocolesterol (b) origina-se na pele pela ação de raios ultra-violeta B

e inicia a síntese de colecalciferol - D₃ (c), enquanto o ergosterol – D₂ (d) tem origem vegetal. As estruturas apresentadas para 25(OH)D₃ (e) e 1 α ,25(OH)₂D₃ (f) são aquelas derivadas do colecalciferol. Modificado de Castro (2011)²⁸.

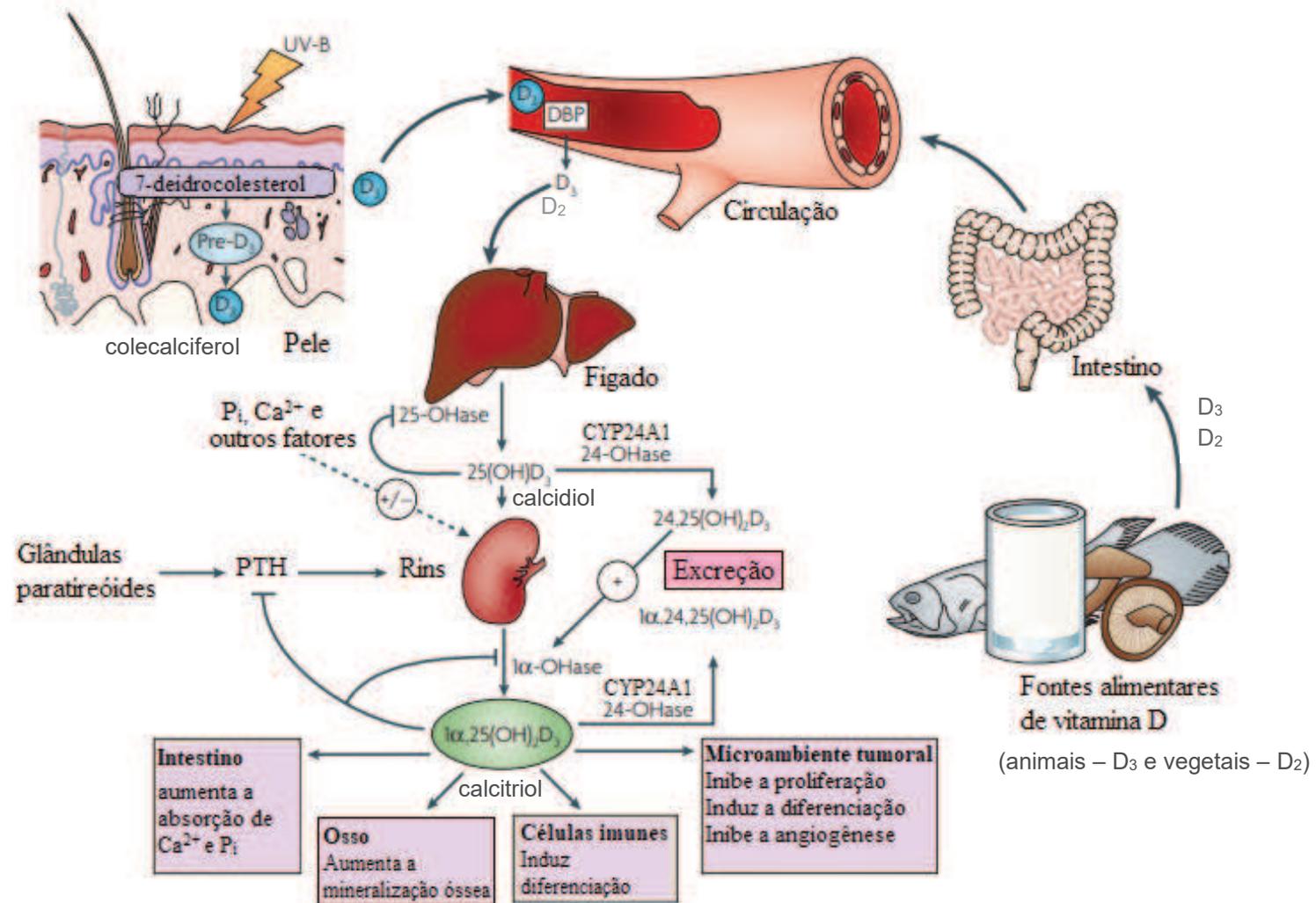


Figura 2. Representação da via metabólica da vitamina D. Adaptado de Deeb et al. (2007)²⁶. UVB= raio ultra-violeta B; PTH= paratormônio; CYP24A1= *Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1*; Ca²⁺= cálcio; Pi= íons fosfato livres; DBP= *Vitamin D-binding protein*.

Por apresentar meia-vida de 10 a 50 dias, a 25(OH)D é usada como um biomarcador sérico de vitamina D, enquanto a 1,25(OH)₂D tem meia-vida de 4 a 6 horas^{24,27}. Indica-se a dosagem de 1,25(OH)₂D diante de suspeita de resistência à vitamina D, como no raquitismo dependente e no resistente à vitamina D²⁸. Ainda não há consenso sobre os valores séricos de referência para a vitamina D. Nesse contexto, o valor padrão de avaliação no Brasil foi determinado pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) em conjunto com a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). Considerou-se como recomendável valores >20 ng/mL para população saudável (até 60 anos), e valores entre 30 e 60 ng/mL para grupos de risco como idosos, gestantes, lactantes, pacientes com raquitismo/osteomalácia, osteoporose, história de quedas e fraturas, causas secundárias de osteoporose (doenças e medicações), hiperparatiroidismo, doenças inflamatórias, autoimunes, renais crônicas e síndromes de má-absorção clínicas ou pós-cirúrgicas. Valores >100 ng/mL são considerados com risco de toxicidade e hipercalcemia³⁰. Entretanto, há indicação de 30 ng/mL como o valor mínimo desejável para a saúde óssea e redução de mortalidade por doenças crônicas na população geral³¹. Há referência que o nível satisfatório de 25(OH)D é o necessário para manter o PTH em níveis adequados, tendo em vista que o PTH é estimulado pela hipocalcemia decorrente de nível reduzido de 1,25(OH)₂D²⁸.

Reconhecidamente, a vitamina D tem papel importante como reguladora da fisiologia osteomineral, participando de várias etapas do ciclo celular e na regulação de genes e vias de sinalização que afetam a homeostase de cálcio^{19,20}. Tem sido crescente o interesse pela vitamina D nas últimas décadas, constatando-se o envolvimento de 1,25(OH)₂D, mediado pelo receptor de vitamina D (VDR), com inflamação,

angiogênese, apoptose, diferenciação, crescimento e inibição da proliferação celular^{28,32}, como também em vários processos patológicos, incluindo doença cardiovascular, doenças autoimunes e diabetes mellitus tipo 2^{33,34}. Sua forma ativa, com papel na apoptose, contribui para inibição do crescimento de células de câncer de próstata³⁵, além de efeito antifibrótico, antiproliferativo e anti-inflamatório no fígado³².

Estudos epidemiológicos demonstram baixos níveis de vitamina D em uma parcela significativa da população mundial, independente de idade, etnia e localização geográfica^{36,37}. No Brasil, há deficiência de 25(OH)D já entre os adolescentes (cerca de 60%), além de adultos jovens (40% a 58%) e idosos (42% a 83%), com frequência crescente em idades mais avançadas³⁸⁻⁴². Ressalta-se que baixos níveis séricos e nutricionais de vitamina D estão associados com doenças crônicas, cardiovasculares, autoimunes, infecciosas e câncer^{24,25,43}, assim como mortalidade em pacientes com algum tipo de câncer^{23,44}. Estudos relacionam a baixa concentração de 25-hidroxivitamina D sérica como fator de risco para CHC e esteatose hepática^{32,44}, associada também com a progressão da doença^{45,46}. No entanto, ainda há polêmica em relação aos níveis adequados à população e os satisfatórios em casos de hepatopatias⁴⁶⁻⁴⁹.

Reconhecidamente, a meia-vida de 25(OH)D é determinada pela atividade das enzimas CYP27B1 e CYP24A1, assim como de fatores que afetam o transporte e a liberação de 25 (OH)D para as células, incluindo DBP⁵⁰. Nesse caso, a concentração e o genótipo de *DBP* podem alterar o metabolismo e a função da vitamina D^{51,52} influenciando a meia vida de 25(OH)D₃ e 25(OH)D₂⁵⁰. As variantes genéticas de *DBP* estão fortemente relacionadas com a circulação de 25(OH)D, tendo em vista que codifica a proteína que transporta a vitamina D até o fígado para ser convertida na forma

ativa e, então, transportada a outros órgãos e tecidos do corpo^{24,45,53}. As combinações alélicas e fenotípicas do gene mostram variações nas concentrações séricas entre as etnias^{53,54}.

Desse modo, alterações nos níveis plasmáticos de 25(OH)D podem estar relacionadas à diferença na afinidade das vitaminas D₂ e D₃ ou de seus metabolitos pela DBP ou, devido ainda, a hidroxilases e VDR. Os metabolitos da vitamina D são principalmente transportados pelo plasma por DBP, cuja afinidade de ligação também pode ser alterada pela variação genética de DBP, portanto, fatores determinantes para a meia-vida plasmática⁵⁵. Nesse caso, há referência de redução na meia vida de 25(OH)D₂ comparado a 25(OH)D₃, com os valores de meia vida afetados pela concentração e genótipo de DBP, o que pode divergir nas populações⁵⁰.

1.3 Variantes Genéticas

Proteína transportadora da vitamina D (DBP ou Gc-globulina)

O gene *DBP*, também conhecido como Gc-globulina (*group-specific component*), localiza-se no cromossomo 4q12-q13 humano^{56,57}. Codifica uma glicoproteína sérica, multifuncional, pertencente à família da albumina, responsável pelo transporte da vitamina D da circulação até o fígado, assim como também de seus metabolitos. Essa proteína participa também de inúmeras funções nas vias metabólicas e biológicas, destacando-se a regulação do desenvolvimento ósseo, incluindo captura de actina, e modulação de respostas imunes⁵⁶⁻⁵⁹.

Acrescenta-se, ainda, seu papel na eliminação de células mortas ou lesadas, ativação de macrófagos e quimiotaxia de neutrófilos em condições inflamatórias⁶⁰. Como a inflamação é considerada um importante contribuinte para carcinogênese, e as

células inflamatórias, como macrófagos e neutrófilos, são os principais componentes de defesa contra as células cancerígenas⁶¹, tem sido crescente o estudo de DBP em relação a carcinogênese e progressão do câncer⁶².

É relatada relação inversa entre DBP circulante e risco de câncer pancreático e carcinoma de células renais^{63,64}, assim como a modulação da vitamina D pela DBP no câncer de próstata⁶⁵. Nesse contexto, por ser sintetizada no fígado, os pacientes com deficiência hepática como cirrose e CHC apresentam concentrações séricas reduzidas de DBP^{57,66}. Reconhecidamente, a deficiência da vitamina D, identificada geralmente pela quantificação sérica de 25(OH)D, está associada a diversos tipos de doenças como câncer, doenças imunológicas, diabetes, entre outras, além de mortalidade^{23,44,57}. Entretanto, são escassos os estudos elucindo o efeito de DBP relacionado à vitamina D nas doenças hepáticas⁵⁷.

Ressalta-se que o gene *DBP* apresenta mais de 120 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)⁶², cuja distribuição pode variar com a etnia^{54,57,67,68}. Há referência, ainda, da influência de seus fenótipos na afinidade de ligação com metabólitos da vitamina D^{45,50,57,68}. Nesse caso, as variantes genéticas *DBP*-rs4588 e *DBP*-rs7041, associam-se com níveis séricos reduzidos de 25(OH)D^{54,68} podendo apresentar consequências clínicas^{24,68}, o que necessita esclarecimento para cirrose e CHC.

Citocromo P450 família 24 subfamília A membro 1 (CYP24A1)

O CYP24A1 é um componente do citocromo P450, cujo gene localizado no cromossomo 20q13.2–q13.3 humano⁶⁹ codifica a 25-hidroxivitamina D₃-24-hidroxilase. Essa enzima catalisa a conversão de 25(OH)D₃ e 1,25(OH)₂D₃ em produtos

hidroxilados, que constituem a degradação da molécula de vitamina D⁷⁰ (Figura 3).

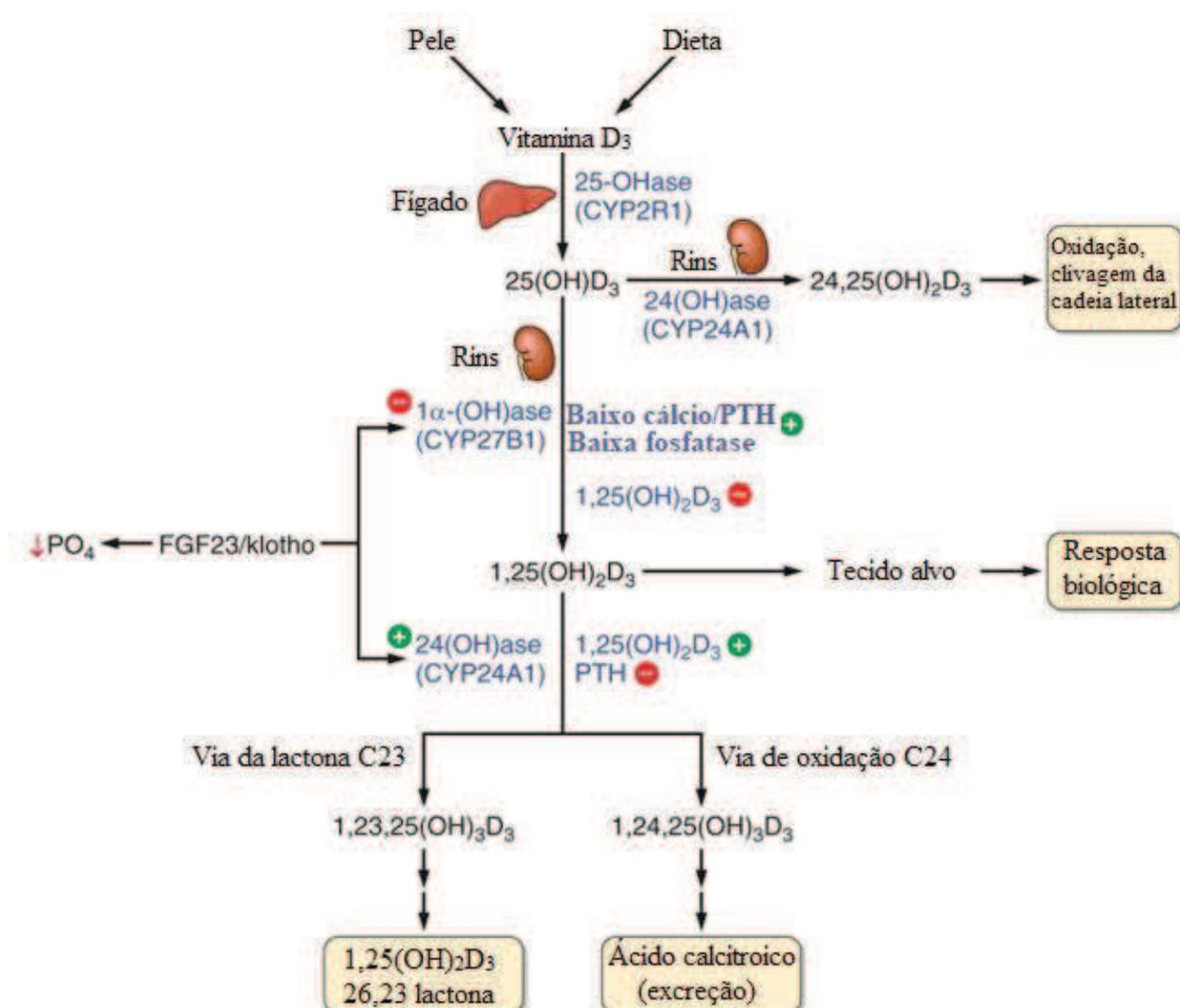


Figura 3. Representação da via metabólica da vitamina D. O paratormônio (PTH), FGF23/klotho e 1,25(OH)₂D₃ regulam os níveis de 1,25(OH)₂D₃, que suprimem a expressão de *CYP27B1* inibindo a síntese proteica e induzem *CYP24A1* promovendo o catabolismo da forma ativa da vitamina D. A partir da 1,25(OH)₂D₃, o *CYP24A1* pode catalisar a via da lactona C23 formando a 1,25(OH)₂D₃-26,23 lactona assim como a via de oxidação C24, formando o ácido calcitrico que será excretado pelo corpo. Adaptado de Christakos et al. (2016)⁷¹.

Essa enzima mitocondrial age na hidroxilação dos átomos de carbono 23 e 24 e, portanto, está envolvida na regulação da concentração de vitamina D^{28,72}. Esse processo está relacionado com o excesso de 1,25(OH)₂D, que é convertido no metabólito 24,25(OH)₂D₃ nos rins, sendo excretado principalmente pelas fezes como ácido calcitroico¹⁹ (Figura 3). Isso ocorre como proteção do organismo contra a hipercalcemia, limitando os níveis da forma ativa da vitamina D nas células e mantendo a homeostase da vitamina D⁶⁹. Adicionalmente, o aumento da expressão de *CYP24A1* e atividade da respectiva enzima 24-hidroxilase associa-se com a degradação de 25(OH)₂D₃ em 24,25(OH)₂D₃, o que pode estar relacionado com alteração do nível sérico de 25(OH)₂D₃⁵⁷ (Figura 3).

Fator de crescimento fibroblástico (FGF23), PTH, klotho e 1,25(OH)₂D₃ estão diretamente relacionados com a regulação dos níveis de 1,25(OH)₂D₃ (Figura 3). O FGF23 juntamente com klotho, suprime a expressão de *CYP27B1* (inibindo a síntese) e induz *CYP24A1* (promovendo o catabolismo da forma ativa da vitamina D). A partir da 1,25(OH)₂D₃, o *CYP24A1* pode catalisar a via da lactona C23 formando a 1,25(OH)₂D₃-26,23 lactona, assim como a via de oxidação C24, formando o ácido calcitroico⁷¹.

Ressalta-se que a vitamina D, na sua forma ativa 1,25(OH)₂D, regula vários genes incluindo o efetor chave de seu catabolismo, o *CYP24A1*⁷³ relacionado ao câncer de próstata⁷⁴, cuja expressão apresenta-se aumentada nos pacientes em estágio avançado da doença³⁵. Além disso, variantes genéticas de *CYP24A1* (rs6013897) associam-se a reações inflamatórias⁷⁵, o que deve ser esclarecido nas hepatopatias.

1.4 Objetivos

Avaliar a associação de polimorfismos genéticos de *DBP* e *CYP24A1* com cirrose com ou sem CHC e sua relação com níveis séricos de vitamina D, considerando perfil clínico, bioquímico e hábitos de vida.

1.5 Objetivos Específicos

1. Analisar a distribuição alélica e genotípica de polimorfismos de *DBP* (rs4588 e rs7041) e *CYP24A1* (rs6013897) em pacientes com cirrose com ou sem CHC, comparado a indivíduos sem hepatopatias.

2. Identificar haplótipos derivados dos polimorfismos de *DBP* nos referidos grupos.

3. Analisar a associação entre os referidos polimorfismos e os parâmetros demográficos e clínicos, além de nível sérico de vitamina D e sobrevida.

4. Avaliar a razão de chance para as referidas hepatopatias, considerando os genótipos e haplótipos de risco e os parâmetros demográficos e clínicos, assim como sobrevida.

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

2.1 Casuística

Durante o período foram estudados 383 indivíduos, sendo 158 pacientes com cirrose com ou sem CHC, independente da etiologia, e 225 indivíduos sem doenças hepáticas (grupo controle). Os pacientes foram atendidos e selecionados nos Ambulatórios de Gastroenterologia e Transplante de Fígado, e Instituto do Câncer do Hospital de Base/Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - HB/FAMERP. Os pacientes foram distribuídos em: Grupo Total (GTotal) = 158, sendo subdivididos em Grupo 1 (G1) = 60 com diagnóstico de cirrose com CHC (46 a 81 anos); Grupo 2 (G2) = 98 com cirrose isolada (16 a 71 anos).

O grupo controle (G3: N= 225 indivíduos; 20 a 84 anos) foi selecionado no Hemocentro – HB/FAMERP e incluiu também indivíduos voluntários. Destes, foram selecionados os que já possuíam prontuário de atendimento no Serviço de Referência HB/FAMERP, cujos resultados de exames bioquímicos (aspartato aminotransferase - AST, alanina aminotransferase - ALT, gama-glutamilttransferase - GGT) e ou de imagem (ultrassom de abdômen) confirmaram a ausência de doenças hepáticas.

Incluíram-se como critérios de exclusão diabetes tipo 1, doença de Crohn, tuberculose^{76,77}, hanseníase⁷⁸, esclerose múltipla, hepatite autoimune⁷⁹, psoríase⁸⁰, doença de Graves⁸¹, e o uso de suplementos vitamínicos com vitamina D.

O diagnóstico de cirrose foi realizado pela combinação de critérios clínicos (fígado reduzido de volume, superfície irregular e consistência aumentada, esplenomegalia e sinais periféricos de hepatopatia crônica e hipertensão portal); laboratoriais (plaquetopenia, hipoalbuminemia e distúrbios da coagulação) e imagenológicos (fígado reduzido de volume, superfície irregular, sinais de hipertensão

portal) presentes na doença, e por biópsia, quando necessário⁸².

O diagnóstico de CHC foi realizado de acordo com as diretrizes de prática da *American Association for the Study of Liver Disease (AASLD)*, que incluem exames de imagem (tomografia computadorizada, ressonância magnética), sorologia de alfafetoproteína (AFP) e biópsia, que é indicada quando o exame de imagem for inconclusivo⁸³.

O grau de estadiamento para cirrose e CHC foi classificado pelos métodos de Child-Pugh e MELD (*Model for End-Stage Liver Disease*), ambos usados para classificar a gravidade da doença hepática⁸⁴.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética - CEP/FAMERP – Processo número 435/2011 e 6910/2011 (Anexo I). Todos os indivíduos foram informados e aceitaram participar do estudo pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II).

2.2 Métodos

Todos os participantes foram submetidos a coleta de uma amostra de sangue periférico (5 mL) em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), para extração de DNA genômico. Para os subgrupos de pacientes (N=30) e controles (N=20) submetidos também a dosagem sérica de vitamina D e paratormônio (PTH) foram coletados 5 mL de sangue em tubo seco, para análise no Laboratório Central do complexo HB/FAMERP. Os subgrupos foram assim constituídos: GTd = 30 pacientes do grupo total, sendo 4 com cirrose e CHC (G1d), e 26 com cirrose isolada (G2d); e G3d = 20 indivíduos do grupo controle sem hepatopatias. Considerou-se valores alterados para vitamina D, níveis séricos <30 ng/mL³¹ e para PTH <15 e >65 pg/mL⁸⁵.

2.2.1 Extração de DNA

As amostras sanguíneas foram processadas no laboratório do Núcleo de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular – NPBIM/FAMERP para a extração do DNA genômico de sangue total. Essa técnica consiste de precipitação salina realizada em três etapas, compreendendo: (I) lise das células sanguíneas, (II) desproteinização e (III) precipitação do DNA e resuspensão⁸⁶ (Anexo III). Em seguida, foi analisada a integridade das amostras em gel de agarose 1%.

Após extração, o DNA foi quantificado no espectrofotômetro e fluorospectrometro NanoDropTM modelo ND-1000 (*Thermo ScientificTM*) para análise de pureza e concentração das amostras, considerando-se razão de absorbância entre 260 e 280 nm e 1,7 a 2,0 ng/ μ L, respectivamente. As amostras foram armazenadas em freezer – 80 °C.

2.2.2 Genotipagem por reação em cadeia da polimerase-PCR em tempo real

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) de *DBP* (rs4588 e rs7041) e *CYP24A1* (rs6013897) foram genotipados com ensaios *TaqMan*[®] SNP *Genotyping/Assays-on-Demand*, com os *primers* e sondas descritos por Bailey et al. (2007)⁸⁷, conforme as recomendações do fabricante (Applied Biosystems; Quadro 1).

A amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em volume final de 5 μ L de amostra em cada um dos 96 poços da placa. A solução final, em cada poço, foi composta pela mistura de 1,375 μ L de água Depc (dietil pirocarbonato), 2,5 μ L *TaqMan*[®] *Genotyping Master Mix* (Applied Biosystems - Thermo ScientificTM), 0,125 μ L da Sonda *TaqMan*[®] SNP *Genotyping Assays* para cada

polimorfismo e 1 µL de DNA diluído. A diluição foi essencial devido a impossibilidade do aparelho de PCR em tempo real ler valores acima de 20 ng, o que ocorreu com frequência nas amostras analisadas. Este protocolo foi indicado para padronização pela empresa fornecedora (Thermo Fisher Scientific). As reações para amplificação dos segmentos polimórficos foram conduzidas às seguintes termociclagens: 95°C por 10 minutos, seguido de 47 ciclos a 92 °C por 15 segundos cada e 60 °C por 1 minuto, no equipamento StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), para todos os polimorfismos analisados de *DBP* (rs4588 e rs7041) e *CYP24A1* (rs6013897). A análise dos alelos foi realizada pelo programa StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems).

Quadro 1. Especificações para os polimorfismos da proteína transportadora da vitamina D (*DBP*) e do citocromo P450 família 24 subfamília A membro 1 (*CYP24A1*) analisados com os ensaios *TaqMan*[®] *SNP Genotyping* (Applied Biosystems).

Gene	Identificação SNP	Polimorfismo	Aminoácido	Localização NCBI GRCh38	Ensaio
<i>DBP</i>	rs4588 (éxon)	C>A	Lys 420 Thr	Chr.4: 71752606	C__8278879_10
	rs7041 (éxon)	G>T	Asp 416 Glu	Chr.4: 71752617	C__3133594_30
<i>CYP24A1</i>	rs6013897 (região intergênica)	A>T	Não codificante	Chr 20: 54125940	C__29958084_10

NCBI: *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.2.3 Perfil demográfico, clínico, bioquímico e hábitos de vida

Todos os participantes foram submetidos a um questionário (Anexo IV) para coleta de perfil demográfico (sexo e idade), bioquímico (AST, ALT, GGT, AFP, bilirrubina e albumina), comorbidades (hipertensão arterial sistêmica - HAS e diabetes mellitus - DM), e hábitos de vida (tabagismo e etilismo). Os dados foram obtidos

também em prontuário médico eletrônico ou físico e protocolos pré-estabelecidos para seguimento de rotina dos pacientes nos referidos serviços.

Etilismo foi definido como consumo crônico contínuo ou periódico de bebidas alcoólicas >40g de álcool/dia, visto que já é considerado risco significativo para a saúde¹⁷. Considerou-se tabagismo, consumo passado ou presente de qualquer tipo ou quantidade de tabaco diariamente⁸⁸.

Definiu-se HAS valores de pressão sistólica ≥ 140 mmHg e/ou diastólica 90 mmHg⁸⁹. Para diabetes mellitus, foram considerados níveis séricos de glicemia ≥ 126 mg/dL (em jejum) e ≥ 200 mg/dL (2 horas após sobrecarga com 75 g de glicose)⁹⁰.

2.2.4 Análise estatística

Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado foi aplicado para analisar variáveis qualitativas, incluindo frequências genótípicas e alélicas, sexo, distribuição de valores alterados para perfil bioquímico, comorbidades e hábitos de vida. Teste-t ou Mann-Whitney foi utilizado na análise de variáveis quantitativas (idade e perfil bioquímico). As análises foram realizadas no programa *GraphPad Prism* (versão 5.0). A curva atuarial (Kaplan-Meier) de sobrevida foi analisada considerando os genótipos com pelo menos um alelo polimórfico e o genótipo homocigoto selvagem, pelo software *StatsDirect Statistical Analysis*.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi analisado para cada SNP, nos grupos caso e controle, pelo uso do teste Qui-quadrado⁹¹, disponível no programa *Arlequin* v. 3.11⁹². Utilizou-se também esse programa na associação entre os SNPs por meio do teste de desequilíbrio de ligação (DL)⁹³. Os haplótipos derivados dos SNPs em LD, bem como os demais haplótipos, foram analisados no programa *Haploview*⁹⁴. As diferenças nas

frequências haplotípicas entre os grupos caso e controle foram determinadas pelo teste Qui-quadrado ou Fisher, com o programa *GraphPad Prism* (versão 5.0); nesta análise foram removidos os haplótipos com frequência menor que 0,05. O cálculo da regressão logística, no programa *Stats Direct* utilizando comparações múltiplas, apontou os fatores independentes e a razão de chance para o desenvolvimento da cirrose com ou sem CHC. Para as análises comparativas entre os grupos, foi admitido nível de significância para valor $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Perfil Clínico-Demográfico e Hábitos de Vida (Tabela 1)

Houve prevalência do sexo masculino em todos os grupos (GTotal=78,5%; G1=83,3%; G2=75,5% e G3=56,4%), destacando-se em pacientes com cirrose e CHC (G1) em comparação ao grupo com cirrose (G2; $P=0,0002$) e controles ($P=0,0018$). Tabagismo e etilismo foram mais frequentes em pacientes (GTotal=46,8% e 62,0%, respectivamente) em relação a controles (G3=20,0%; 11,6%, respectivamente; $P<0,0001$, para ambos), com semelhança entre os grupos de pacientes ($P>0,05$); o mesmo foi observado para diabetes mellitus (DM) (GTotal=26,0% versus G3=3,6%; $P<0,0001$). Para hipertensão arterial sistêmica houve semelhança entre os grupos ($P>0,05$).

3.2 Perfil Genético

DBP-rs4588 (Tabela 2)

O genótipo homozigoto selvagem (C/C) e o respectivo alelo C destacaram-se em todos os grupos ($P>0,05$; Tabela 2). No entanto, prevaleceu em mulheres do grupo controle (G3=56,1%), comparado àquelas com cirrose e CHC (G1=20%; $P=0,0440$) que apresentaram, por outro lado, prevalência de genótipos com pelo menos um alelo polimórfico ($_ / A$: G1=80% versus G3=43,9%; $P=0,0440$). Notou-se, ainda, maior frequência do alelo polimórfico (A) em pacientes com cirrose e CHC (G1=0,50), comparado ao grupo com cirrose isolada (G2=0,21; $P=0,0346$) e controles (G3=0,26; $P=0,0446$).

DBP-rs7041 (Tabela 3)

Houve semelhança entre os grupos em todas as comparações para distribuição genotípica e alélica ($P>0,05$). Destacou-se, no entanto, o genótipo heterozigoto (T/G) em pacientes ($G_{Total}=42,9\%$) e controles ($G3=46,7\%$), enquanto o alelo selvagem (T) em pacientes ($G_{Total}=0,54$) e o alelo polimórfico (G) nos controles ($G3=0,51$). Quanto a distribuição por sexo, nos homens destacou-se o genótipo homozigoto selvagem (T/T) em G2 (40,5%), enquanto o heterozigoto (T/G) em G1 (48%) e G3 (44,1%); o alelo (T) prevaleceu em pacientes ($G_{Total}=0,54$) e controles ($G3=0,51$). O sexo feminino mostrou predomínio do genótipo heterozigoto (T/G) em pacientes ($G_{Total}=58,8\%$) e controles ($G3=50\%$). O alelo selvagem (T) destacou-se em G1 (0,65), e o alelo polimórfico (G) em G2 (0,56) e G3 (0,54).

CYP24A1 (Tabela 4)

O genótipo homozigoto mutante (T/T) prevaleceu em todos os grupos ($P>0,05$), assim como o alelo mutante (T). Por outro lado, o genótipo homozigoto selvagem (A/A) foi mais frequente em pacientes com cirrose isolada ($G2=11,2\%$), comparado àqueles com cirrose e CHC ($G1=1,7\%$; $P=0,0309$). Os genótipos com pelo menos um alelo polimórfico ($_ / T$) predominaram em G1 (98,3%) versus G2 (88,8%; $P=0,0309$).

A análise da combinação dos genótipos de risco para os polimorfismos de *DBP* (rs4188 e rs7041) e *CYP24A1* (rs6013897), em relação à combinação dos respectivos genótipos selvagens, mostrou semelhança entre os grupo ($P=1,0000$; dados não apresentados).

Tabela 1. Perfil demográfico, hábitos de vida e comorbidades no grupo total de pacientes (GTotal), pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular (G1), com cirrose isolada (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Característica	GTotal (N=158)		G1 (N=60)		G2 (N=98)		G3 (N=225)		*Valor-P			
	N	%	N	%	N	%	N	%	GTotal x G3	G1 x G2	G1 x G3	G2 x G3
Sexo	N	%	N	%	N	%	N	%				
Masculino	124	78,5	50	83,3	74	75,5	127	56,4	<0,0001	0,0002	0,0018	0,3361
Feminino	34	21,5	10	16,7	24	24,5	98	43,6				
Hábito de vida	N	%	N	%	N	%	N	%				
Tabagismo	74	46,8	27	45,0	47	48,0	45	20,0	<0,0001	0,8434	<0,0001	<0,0001
Etilismo	98	62,0	39	65,0	59	60,2	26	11,6	<0,0001	0,6643	<0,0001	<0,0001
Comorbidade	N	%	N	%	N	%	N	%				
DM	41	26,0	16	26,7	25	25,5	8	3,6	<0,0001	0,8721	<0,0001	<0,0001
HAS	53	33,5	18	30,0	35	35,7	70	31,1	0,6959	0,5723	0,9934	0,4947

P=Nível de significância; *Teste Qui-quadrado ou Fisher; N=Número de indivíduos; DM=Diabetes mellitus; HAS=Hipertensão arterial sistêmica.

Tabela 2. Frequências alélicas e genótípicas para o polimorfismo *DBP*-rs4588 no grupo total de pacientes (GTotal), pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular (G1), pacientes com cirrose isolada (G2) e indivíduos sem a doença (G3).

Perfil Genético	GTotal N= 158		G1 N= 60		G2 N= 98		G3 N= 225		*Valor-P			
	DBP (rs4588)								GTotal x G3	G1 x G2	G1 x G3	G2 x G3
Genótipo	N	%	N	%	N	%	N	%				
C/C	76	48,1	27	45,0	49	50,0	119	52,9	0,4129	0,6553	0,3468	0,7214
C/A	68	43,0	25	41,7	43	43,9	86	38,2	0,4007	0,9149	0,7360	0,4063
A/A	14	8,9	8	13,3	6	6,1	20	8,9	0,9924	0,2078	0,4333	0,5368
_/A	82	51,9	33	55,0	49	50,0	106	47,1	0,4129	0,6553	0,3468	0,7214
Alelo	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs				
C	220	0,70	79	0,65	141	0,72	324	0,72	0,5262	0,3081	0,2278	0,9873
A	96	0,30	41	0,34	55	0,28	126	0,28				
Masculino	N (124)	%	N (50)	%	N (74)	%	N (127)	%				
Genótipo												
C/C	60	48,4	25	50,0	35	47,3	64	50,4	0,8480	0,9106	0,9624	0,7816
C/A	52	42,0	19	38,0	33	44,6	51	40,2	0,8745	0,5861	0,9255	0,6406
A/A	12	9,7	6	12,0	6	8,1	12	9,4	0,9509	0,6822	0,8186	0,9482
_/A	64	51,6	25	50,0	39	52,7	63	49,6	0,8480	0,9106	0,9624	0,7816
Alelo	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs				
C	172	0,69	69	0,69	103	0,70	179	0,70	0,8606	0,9206	0,8859	0,9422
A	76	0,31	31	0,31	45	0,30	75	0,30				
FEMININO	N (34)	%	N (10)	%	N (24)	%	N (98)	%				
Genótipo												
C/C	16	47,0	2	20,0	14	58,3	55	56,1	0,4754	0,0630	0,0440	0,8447
C/A	16	47,0	6	60,0	10	41,7	35	35,7	0,3340	0,4569	0,1746	0,7599
A/A	2	5,9	2	20,0	0	0	8	8,2	1,0000	0,0802	0,2319	0,3535
_/A	18	53,0	8	80,0	10	41,7	43	43,9	0,4754	0,0630	0,0440	0,8447
Alelo	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs				
C	48	0,70	10	0,50	38	0,79	145	0,74	0,7004	0,0346	0,0446	0,5769
A	20	0,30	10	0,50	10	0,21	51	0,26				

DBP=*Vitamin D-binding protein*; P=Nível de significância; *Teste Qui-Quadrado ou Fisher; A/A=Genótipo homozigoto selvagem; A/T=Genótipo heterozigoto; T/T=Genótipo homozigoto mutante; N=Número de indivíduos; Freq. abs.=Frequência absoluta.

Tabela 3. Frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo *DBP*-rs7041 no grupo total de pacientes (GTotal), em pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular (G1), pacientes com cirrose isolada (G2) e indivíduos sem a doença (G3).

Perfil Genético	GTotal N= 158		G1 N= 60		G2 N= 98		G3 N= 225		*Valor-P			
									GTotal x G3	G1 x G2	G1 x G3	G2 x G3
DBP (rs7041)												
Genótipo	N	%	N	%	N	%	N	%				
T/T	52	32,9	19	31,7	33	33,7	57	25,3	0,1328	0,9314	0,4114	0,1609
T/G	67	42,4	29	48,3	38	38,8	105	46,7	0,4708	0,3106	0,9328	0,2337
G/G	39	24,7	12	20,0	27	27,6	63	28,0	0,5449	0,3798	0,2777	0,9341
_/G	106	67,1	41	68,3	65	66,3	168	74,7	0,1328	0,9314	0,4114	0,1609
Alelo	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs				
T	171	0,54	67	0,56	104	0,53	219	0,49	0,1582	0,7161	0,1962	0,3465
G	145	0,46	53	0,44	92	0,47	231	0,51				
Masculino	N (124)	%	N (50)	%	N (74)	%	N (127)	%				
Genótipo												
T/T	45	36,3	15	30,0	30	40,5	36	28,4	0,2259	0,3139	0,9726	0,1053
T/G	47	37,9	24	48,0	23	31,1	56	44,1	0,3850	0,0861	0,7624	0,0945
G/G	32	25,8	11	22,0	21	28,4	35	27,6	0,8641	0,5572	0,5694	0,9006
_/G	79	63,7	35	70,0	44	59,5	91	71,6	0,2259	0,3139	0,9726	0,1053
Alelo	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs				
T	137	0,54	54	0,54	83	0,56	128	0,51	0,3181	0,8468	0,6219	0,3184
G	111	0,46	46	0,46	65	0,44	126	0,49				
FEMININO	N (34)	%	N (10)	%	N (24)	%	N (98)	%				
Genótipo												
T/T	7	20,6	4	40,0	3	12,5	21	21,4	0,9177	0,1572	0,2356	0,4026
T/G	20	58,8	5	50,0	15	62,5	49	50,0	0,4913	0,7041	1,2583	0,3838
G/G	7	20,6	1	10,0	6	25,0	28	28,6	0,4945	0,6445	0,2824	0,9237
_/G	27	79,4	6	60,0	21	87,5	77	78,6	0,9177	0,1572	0,2356	0,4026
Alelo	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs				
T	34	0,50	13	0,65	21	0,44	91	0,46	0,7134	0,1833	0,1775	0,8633
G	34	0,50	7	0,35	27	0,56	105	0,54				

DBP=*Vitamin D-binding protein*; P=Nível de significância; *Teste Qui-Quadrado ou Fisher; A/A= Genótipo homocigoto selvagem; A/T= Genótipo heterocigoto; T/T= Genótipo homocigoto mutante; N=Número de indivíduos; Freq. abs.=Frequência absoluta.

Tabela 4. Frequências alélicas e genótípicas para o polimorfismo *CYP24A1*- rs6013897 no grupo total de pacientes (GTotal), em pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular (G1), pacientes com cirrose isolada (G2) e indivíduos sem a doença (G3).

Perfil Genético	GTotal N= 158		G1 N= 60		G2 N= 98		G3 N= 225		*Valor-P			
									GTotal x G3	G1 x G2	G1 x G3	G2 x G3
CYP24A1 (rs6013897)												
Genótipo	N	%	N	%	N	%	N	%				
A/A	12	7,6	1	1,7	11	11,2	17	7,6	0,9886	0,0309	0,1347	0,3885
A/T	65	41,1	28	46,7	37	37,7	79	35,1	0,2749	0,3481	0,1356	0,7420
T/T	81	51,3	31	51,7	50	51,0	129	57,3	0,2845	0,9371	0,5225	0,3536
_/T	146	92,4	59	98,3	87	88,8	208	92,6	0,9886	0,0309	0,1347	0,3885
Alelo	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs				
A	89	0,28	30	0,25	59	0,30	113	0,25	0,3893	0,3955	0,9801	0,2215
T	227	0,72	90	0,75	137	0,70	337	0,75				
Masculino	N (124)	%	N (50)	%	N (74)	%	N (127)	%				
Genótipo												
A/A	9	7,3	1	2,0	8	10,8	12	9,5	0,6901	0,0829	0,1138	0,9467
A/T	53	42,7	24	48,0	29	39,2	47	37,0	0,4244	0,4308	0,2408	0,8754
T/T	62	50,0	25	50,0	37	50,0	68	53,5	0,6633	1,0000	0,7965	0,7349
_/T	115	92,7	49	98,0	66	89,2	115	90,5	0,6901	0,0829	0,1138	0,9467
Alelo	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs				
A	71	0,28	26	0,26	45	0,30	71	0,28	0,9449	0,5421	0,8115	0,6823
T	177	0,72	74	0,74	103	0,70	183	0,72				
FEMININO	N (34)	%	N (10)	%	N (24)	%	N (98)	%				
Genótipo												
A/A	3	8,8	0	0	3	12,5	5	5,1	0,4239	0,5388	1,0000	0,1900
A/T	12	35,3	4	40,0	8	33,3	32	32,6	0,9439	0,7139	0,7284	0,9493
T/T	19	55,9	6	60,0	13	54,2	61	62,2	0,6523	1,0000	1,0000	0,6220
_/T	31	91,2	10	100	21	87,5	93	94,9	0,4239	0,5388	1,0000	0,1900
Alelo	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs	N	Freq. Abs				
A	18	0,26	4	0,20	14	0,29	42	0,21	0,4921	0,5531	1,0000	0,3415
T	50	0,74	16	0,80	34	0,71	154	0,79				

CYP24A1=Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1; P=Nível de significância; *Teste Qui-Quadrado ou Fisher; A/A=Genótipo homocigoto selvagem; A/T=Genótipo heterocigoto; T/T=Genótipo homocigoto mutante; N=Número de indivíduos; Freq. abs.=Frequência absoluta.

3.3 Hardy-Weinberg (Tabela 5)

Foi observado equilíbrio de Hardy-Weinberg para a distribuição de genótipos de todos os SNPs, nos grupos de pacientes e controles ($P > 0,05$).

Tabela 5. Distribuição genotípica observada (H_o) e esperada (H_e) para os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) de *DBP* (*vitamin D-binding protein*) e *CYP24A1* (*cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1*), com os respectivos valores de P para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), em pacientes com cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular e indivíduos sem hepatopatias (controle).

SNP	Paciente (N=158)			Controle (N=225)		
	H_o	H_e	P-HWE	H_o	H_e	P-HWE
<i>DBP</i>						
rs4588	0,43038	0,42435	1,00000	0,38222	0,40410	0,41186
rs7041	0,42405	0,49819	0,07755	0,46667	0,50076	0,35441
<i>CYP24A1</i>						
rs6013897	0,41139	0,40593	1,00000	0,35111	0,37695	0,37402

N=número de indivíduos.

3.4 Desequilíbrio de Ligação e Haplótipos de *DBP* (Tabela 6)

A análise do desequilíbrio de ligação (DL) para os SNPs de *DBP*, mostrou associação alélica de rs4588-rs7041 em pacientes e controles ($P=0,00000$, para ambos, dados não apresentados).

Os haplótipos foram reconstruídos para o conjunto de SNPs de *DBP* (rs4588 e rs7041), e comparados entre pacientes com cirrose com ou sem CHC e controles. O haplótipo CG destacou-se em pacientes (45,9%) e controles (51,3%), seguido de AT

(30,4% e 28%, respectivamente) e CT (23,7% e 20,7%, respectivamente), sem diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$).

Tabela 6. Haplótipos dos genótipos para *DBP* em pacientes com cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular e indivíduos sem a doença (controles).

Bloco Haplótico	Frequência (N= 383)		Paciente (N = 158)		Controle (N= 225)		Qui-quadrado	Valor-P
	N	%	N	%	N	%		
<i>DBP</i>								
CG	188	49,1	73	45,9	115	51,3	2,204	0,1376
AT	111	29,0	48	30,4	63	28,0	0,511	0,4748
CT	84	21,9	37	23,7	47	20,7	1,020	0,3125

Nível de significância; *DBP*=*Vitamin D-binding protein*.

3.5 Perfil Bioquímico (Tabelas 7 e 8)

Níveis séricos elevados de AST destacaram-se em pacientes do sexo masculino com cirrose e CHC (G1: mediana = 65,0 U/L), comparado àqueles com cirrose isolada (G2: mediana=52,0U/L; $P=0,0159$; Tabela 7). O mesmo ocorreu para GGT (G1=115U/L versus G2=84U/L; $P=0,0071$) e AFP em homens (G1: mediana=13.350ng/mL) e mulheres (G1: mediana=1.416,0ng/mL), versus cirrose isolada (G2=2,805ng/mL; $P<0,0001$ e 4,250ng/mL; $P=0,0227$, respectivamente; Tabela 7). Houve semelhança entre os grupos para ALT, bilirrubina e albumina, em ambos sexos ($P>0,05$; Tabela 7).

Valores alterados de GGT e AFP destacaram-se em homens com cirrose e CHC (G1=84% e 62%, respectivamente), comparado àqueles com cirrose (G2=60,8%; $P=0,0102$, e 20,3%, $P<0,0001$, respectivamente; Tabela 8).

Tabela 7. Valores de mediana, mínimo e máximo para perfil bioquímico no grupo total de pacientes (GTotal), pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular (G1) e com cirrose isolada (G2), de acordo com o sexo.

Perfil Bioquímico	GTotal (N=158)	G1 (N= 60)	G2 (N= 98)	Valor-P G1 x G2
AST (U/L)				
Masculino ♦(1-40U/L)	N= 124	N= 50	N= 74	
Mediana	56,0	65,0	52,0	
Mínimo	14,0	17,0	14,0	
Máximo	1.563,0	306,0	1.563,0	^a 0,0159
Média	82,3	83,2	81,7	
Desvio Padrão	143,3	57,7	179,9	
Feminino ♦(1-32U/L)	N= 34	N= 10	N= 24	
Mediana	53,0	38,5	58,5	
Mínimo	11,0	13,0	11,0	
Máximo	236,0	236,0	191,0	^a 0,2338
Média	60,2	57,4	61,4	
Desvio Padrão	47,4	66,7	38,4	
ALT (U/L)				
Masculino ♦(1-41U/L)	N= 124	N= 50	N= 74	
Mediana	32,0	34,0	31,5	
Mínimo	6,0	6,0	8,0	^a 0,4078
Máximo	790,0	255,0	790,0	
Média	51,4	51,5	51,3	
Desvio Padrão	77,9	49,9	92,5	
Feminino ♦(1-33U/L)	N= 34	N= 10	N= 24	
Mediana	33,5	33,5	33,5	^b 0,0940
continua				

Perfil Bioquímico	GTotal (N=158)	G1 (N= 60)	G2 (N= 98)	Valor-P G1 x G2
Mínimo	4,0	16,0	4,0	
Máximo	228,0	228,0	99,0	
Média	45,7	64,9	37,7	
Desvio Padrão	43,1	68,3	24,7	
GGT (U/L)				
Masculino ♦(1-60U/L)	N= 124	N= 50	N= 74	
Mediana	95,00	115,0	84,0	
Mínimo	8,00	30,0	8,0	
Máximo	1.452,00	1.452,0	1.229,0	^a0,0071
Média	157,47	201,52	127,70	
Desvio Padrão	210,42	264,55	159,37	
Feminino ♦(1-40U/L)	N= 34	N= 10	N= 24	
Mediana	106,0	109,5	103,5	
Mínimo	6	28,0	6	
Máximo	1.082,0	438,0	1.082,0	^a 0,4963
Média	163,97	166,5	162,92	
Desvio Padrão	213,27	145,73	238,63	
AFP (♦0-7 ng/mL)				
Masculino	N= 124	N= 50	N= 74	
Mediana	4,595	13,350	2,805	^a<0,0001
Mínimo	0,60	0,90	0,60	
Máximo	48.608,00	48.608,00	780,0	
Média	1.040,26	2.529,07	34,30	
Desvio Padrão	5.133,20	7895,1	119,44	

continua

Perfil Bioquímico	GTotal (N=158)	G1 (N= 60)	G2 (N= 98)	Valor-P G1 x G2
Feminino	N= 34	N= 10	N= 24	
Mediana	5,5	1.416,0	4,250	^a 0,0227
Mínimo	0,67	1,100	0,670	
Máximo	107.040,00	107.040,0	10.540,0	
Média	4.802,98	15.250,95	449,66	
Desvio Padrão	18.715,0	3.3176,0	2.149,4	
Bilirrubina (♦0-1mg/dL)				
Masculino	N= 124	N= 50	N= 74	
Mediana	1,70	1,53	1,99	
Mínimo	0,20	0,30	0,20	^a 0,1755
Máximo	22,7	8,1	22,7	
Média	2,58	1,87	3,07	
Desvio Padrão	2,912	1,356	3,531	
Feminino	N= 34	N= 10	N= 24	
Mediana	0,97	0,80	0,99	
Mínimo	0,50	0,50	0,50	
Máximo	20,50	1,87	20,50	^a 0,2338
Média	1,98	0,992	2,395	
Desvio Padrão	3,492	0,4483	4,101	
Albumina (♦3,5-5,2 g/dL)				
Masculino	N= 123	N= 49	N= 74	
Mediana	3,30	3,28	3,30	^b 0,6708
Mínimo	1,60	2,20	1,60	
Máximo	5,32	4,90	5,32	
Média	3,41	3,37	3,43	
continua				

Perfil Bioquímico	GTotal (N=158)	G1 (N= 60)	G2 (N= 98)	Valor-P G1 x G2
Desvio Padrão	0,8201	0,6801	0,9046	
Feminino	N= 34	N= 10	N= 24	
Mediana	3,435	3,245	3,565	^b 0,5313
Mínimo	1,40	2,00	1,40	
Máximo	4,60	4,50	4,60	
Média	3,39	3,263	3,455	
Desvio Padrão	0,8004	0,7251	0,8379	

^aTeste de Mann-Whitney; ^bTeste t; ◆=Valor de referência; N=Número de indivíduos; AST= Aspartato aminotransferase; ALT=Alanina aminotransferase; GGT=Gama glutamiltransferase; AFP= Alfafetoproteína.

Tabela 8. Frequência de valores alterados para perfil bioquímico no grupo total de pacientes (GTotal), em pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular (G1) e cirrose isolada (G2), de acordo com o sexo.

Perfil Bioquímico	GTotal (N= 158)		G1 (N= 60)		G2 (N= 98)		*Valor-P G1 x G2
	N	%	N	%	N	%	
AST (U/L)							
Masculino >40U/L	88	71,0	40	80,0	48	64,9	0,1053
Feminino >32U/L	24	70,6	5	50,0	19	79,2	0,1156
ALT (U/L)							
Masculino >41U/L	43	34,7	22	44,0	21	28,4	0,1095
Feminino >33U/L	17	50,0	5	50,0	12	50,0	>0,9999
GGT (U/L)							
Masculino (N= 124) >60U/L	87	70,2	42	84,0	45	60,8	0,0102
Feminino (N=34) >40U/L	27	79,4	9	90,0	18	75,0	0,6445
AFP (>7ng/mL)							
Masculino (N= 124)	46	37,1	31	62,0	15	20,3	<0,0001
Feminino (N=34)	16	47,1	7	70,0	9	37,5	0,1341
Bilirrubina (>1mg/dL)							
Masculino (N= 124)	92	74,2	36	72,0	56	75,7	0,8028
Feminino (N=34)	15	44,1	4	40,0	11	45,8	1,0000
Albumina (>3,5 ou >5,2 g/dL)							
Masculino (N= 123)	73	59,4	29	59,2	44	59,5	0,9757
Feminino (N=34)	18	53,0	7	70,0	11	45,8	0,2701

*Teste Qui-Quadrado ou Fisher; N= Número de indivíduos; AST= Aspartato aminotransferase; ALT= Alanina aminotransferase; GGT= Gama glutamiltransferase; AFP= Alfafetoproteína.

3.6 Vitamina D e PTH (Figuras 4 e 5, Tabelas 9 e 10 e Apeêndice I)

Níveis séricos de vitamina D mostraram decréscimo em controles (G3d: mediana = 27,06ng/mL), em comparação a pacientes com cirrose com ou sem CHC (GTd: mediana = 38,1ng/mL), embora sem diferença significativa entre os grupos (P=0,0934; Figura 4A). Houve semelhança também para valores de PTH (Figura 4B), mas com acréscimo nos controles (G3d: mediana = 46,93pg/mL), comparado ao grupo de pacientes (GTd: mediana =38,77pg/mL; P=0,3139). Quanto aos valores alterados para vitamina D (<30ng/mL), correspondeu a 30% dos pacientes (GTd) e 35% dos indivíduos sem hepatopatias (G3d), e para PTH (<15 ou >65ng/m) 16,7% e 15%, respectivamente, com semelhança entre os grupos (P>0,05; Tabela 9). Os dados individuais para níveis de vitamina D e PTH são apresentados no Apêndice I.

A distribuição de pacientes com cirrose com ou sem CHC e controles, de acordo com os níveis plasmáticos alterados e recomendados de vitamina D, considerando polimorfismos de *DBP* e *CYP24A1* está representada na Tabela 10. Houve maior frequência de pacientes portadores de genótipos com pelo menos um alelo mutante ($_ / A$) para *DBP*-rs4588 (77,8%) e níveis reduzidos de vitamina D, comparado aos controles (14,3%; P=0,0406). Por outro lado, o grupo controle mostrou maior frequência de indivíduos portadores de genótipos com o alelo mutante e níveis aumentados de vitamina D (76,9%), comparado àqueles com genótipo homozigoto selvagem (*C/C*: 23,1%; P=0,0166). O Apêndice I mostra valores de vitamina D e genótipos com pelo menos um alelo mutante individualmente nos grupos de pacientes e controles.

A análise de correlação entre valores séricos de vitamina D e PTH mostrou correlação positiva moderada em pacientes com cirrose com ou sem CHC ($R^2= 0,3273$), mas não nos controles ($R^2= 0,0106$ – Figura 5).

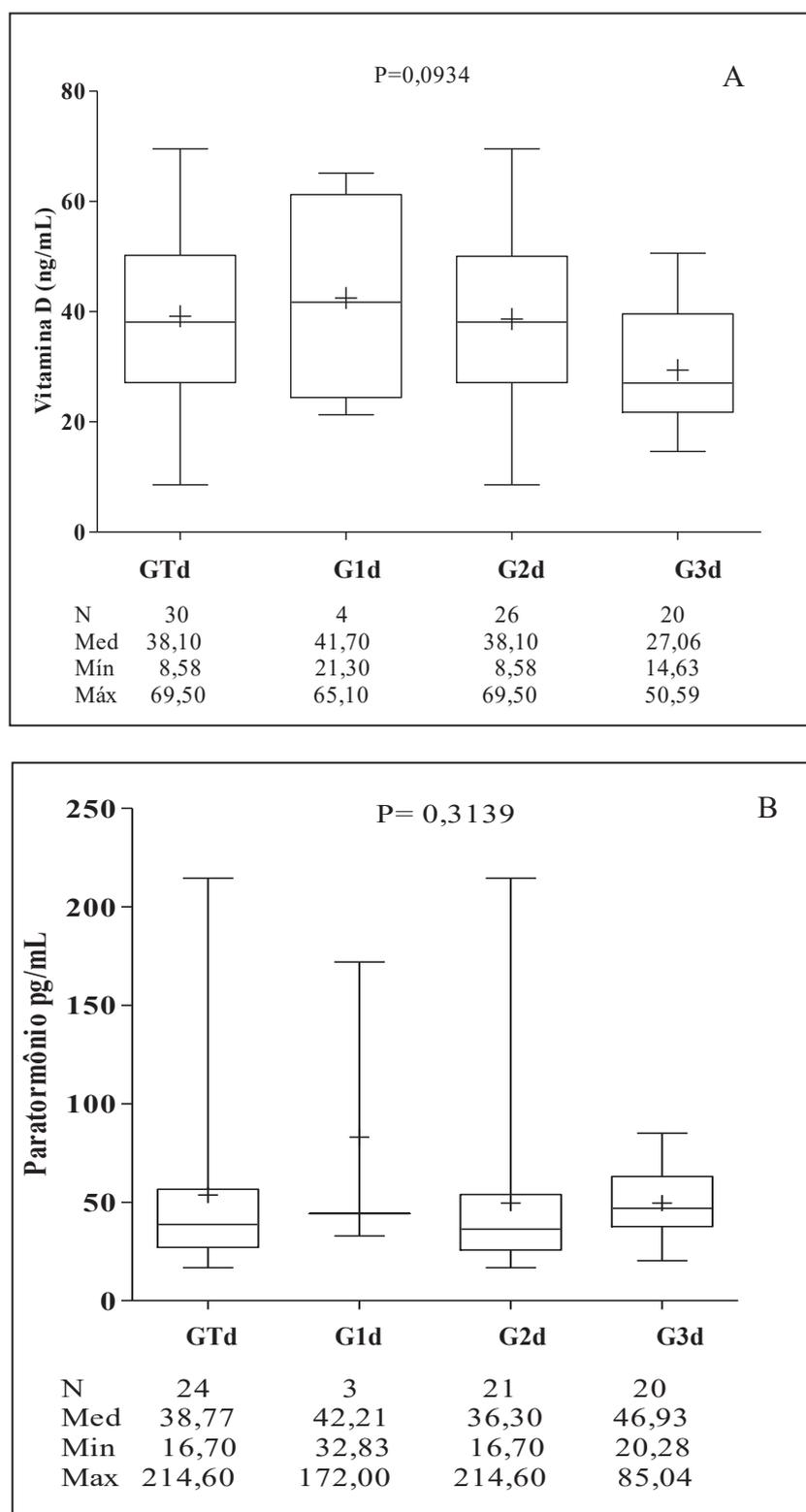


Figura 4. Box plot dos valores de vitamina D (A) e paratormônio (B) em um subgrupo total de pacientes (GTd), pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular (G1d), pacientes com cirrose isolada (G2d), e indivíduos sem hepatopatias (G3d).

Tabela 9. Distribuição de valores alterados e recomendados de vitamina D e paratormônio em subgrupo de pacientes (GTd) com cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular (CHC), com cirrose e CHC (G1d) e com cirrose isolada (G2d), e indivíduos sem hepatopatias (G3d).

	GTd		G1d		G2d		G3d		*Valor-P			
	N	%	N	%	N	%	N	%	GTd x G3d	G1d x G2d	G1d x G3d	G2d x G3d
Vitamina D	N= 30		N= 4		N= 26		N= 20					
♦ < 30 ng/mL	9	30,0	1	25,0	8	30,8	7	35,0	0,9507	1,0000	1,0000	0,7616
Suficiente	21	70,0	3	75,0	18	69,2	13	65,0				
Paratormônio	N= 24		N= 3		N= 21		N= 20					
♦ <15 >65 pg/mL	4	16,7	1	33,3	3	15,0	3	15,0	1,0000	0,4368	0,4529	1,0000
Suficiente	20	83,3	2	66,7	18	90,0	17	85,0				

*Teste Fisher ou Qui-quadrado; P= Nível de Significância; N= Número de Indivíduos; ♦=Valor alterado.

Tabela 10. Distribuição de pacientes com cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular e controles, considerando níveis plasmáticos alterados e recomendados de vitamina D e polimorfismos genéticos de *DBP* (*Vitamin D-binding protein*) e *CYP24A1* (*Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1*).

	Vitamina D < 30 ng/mL				Vitamina D ≥ 30 ng/mL				*Valor-P			
	(a) Paciente (N=9)		(b) Controle (N=7)		(c) Paciente (N=21)		(d) Controle (N=13)		a x b	a x c	b x d	c x d
	N	%	N	%	N	%	N	%				
<i>DBP-</i>												
rs4588												
C/C	2	22,2	6	85,7	9	42,9	3	23,1	0,0406	0,4189	0,0166	0,2919
_/A	7	77,8	1	14,3	12	57,1	10	76,9				
<i>DBP-</i>												
rs7041												
T/T	3	33,3	2	28,6	8	38,1	3	23,1	1,0000	1,0000	1,0000	0,4653
_/G	6	66,7	5	71,4	13	61,9	10	76,9				
<i>CYP24A1-</i>												
rs6013897												
A/A	2	22,2	0	0	3	14,3	0	0	0,4750	0,6220	-	0,2701
_/T	7	77,8	7	100,0	18	85,7	13	100,0				

*Teste Fisher ou Qui-quadrado; P= Nível de Significância; N= Número de Indivíduos.

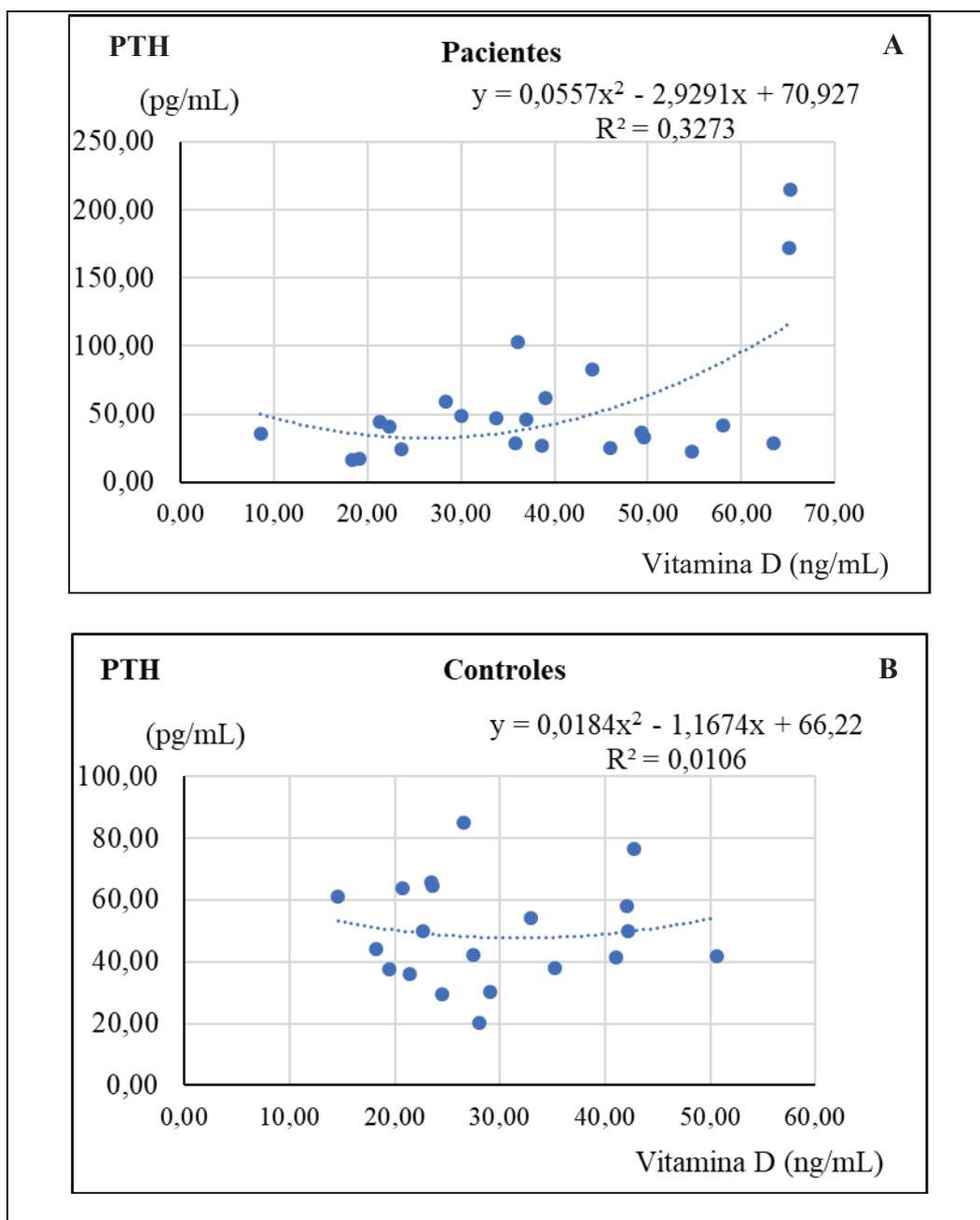


Figura 5 - Análise de correlação de vitamina D e paratormônio (PTH) em (A) pacientes com cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular, e (B) indivíduos sem hepatopatias.

3.7 Fatores Independentes (Tabela 11)

A análise de regressão logística mostrou fatores independentes para cirrose com ou sem CHC (GTotal), como tabagismo (OR=2,05; IC=1,16-3,63; P=0,0129), etilismo (OR=12,68; IC=7,13-22,56; P<0,0001), DM (OR=11,11; IC=4,58-26,97; P<0,0001) e idade (OR=1,03; IC=1,01-1,05; P=0,0031). A equação da regressão logística foi representada por: (logit Y = -3,426751 +0,721182 Tabagismo +2,54012 Etilismo +2,40803 DM +0,03157 Idade).

Para cirrose com CHC (G1), os fatores de risco independentes foram etilismo (OR=24,36; IC=10,25-57,91; P<0,0001), DM (OR=15,27; IC=4,53-51,47; P<0,0001) e idade (OR=1,08; IC=1,04-1,12; P<0,0001). A equação foi assim representada: logit Y = -7,188803 +3,193171 Etilismo +2,726192 DM +0,078054 Idade.

Em relação a cirrose isolada (G2) destacaram-se tabagismo (OR=2,50; IC=1,34-4,65; P=0,004), etilismo (OR=10,51; IC=5,65-19,57; P<0,0001) e DM (OR=10,04; IC=3,85-26,17; P<0,0001). A equação foi assim representada: logit Y = -2,158793 +0,914776 Tabagismo +2,352948 Etilismo +2,306957 DM.

A análise comparativa entre os grupos de pacientes com cirrose e CHC e cirrose isolada mostrou fatores independentes para cirrose com CHC, como aumento de idade (OR=1,08; IC=1,03-1,13; P=0,0005), sexo masculino (OR=3,36; IC=1,17-9,59; P=0,0237), presença de pelo menos um alelo polimórfico de *CYP24A1*-rs6013897 ($_ / T$: OR=14,18; IC=1,50-133,71; P=0,0205), hepatites virais (OR=3,09; IC=1,22-7,81; P=0,0169) e valores alterados de GGT (OR=3,85; IC=1,40-10,58; P=0,009), AFP (OR=5,46; IC=2,32-12,88; P=0,0001) e creatinina (OR=3,58; IC=1,41-9,07; P=0,0071). A equação foi representada por logit Y = -11,490118 +0,08035 Idade +1,211304

Homem +2,651871 CYP24A1 rs6013897 _/T +1,129416 Hepatites Virais +1,348192
GGT +1,698801 AFP +1,276579 Creatinina.

Análise semelhante considerando os subgrupos com dosagem de vitamina D apresentou como fatores independentes para cirrose com ou sem CHC (GTd) etilismo (OR= 21,68; IC= 2,56-183,21; P=0,0047), representada pela equação: $\text{logit } Y = -0,305382 + 3,076717 \text{ Etilismo}$; e para cirrose com CHC (G1d), tabagismo (OR=14,50; IC=1,10-189,46; P=0,0414) e etilismo (OR=12,10; IC=1,09-1,10; P=0,0421). A equação foi representada por: $\text{logit } Y = -1,613143 + 2,67415 \text{ Tabagismo} + 2,493242 \text{ Etilismo}$.

3.8 Análise de Sobrevida (Figuras 6, 7 e 8)

A sobrevida dos pacientes com cirrose com ou sem CHC (GTtotal= 141) foi avaliada pela curva atuarial de Kaplan-Meier, a partir do diagnóstico e genótipos com pelo menos um alelo polimórfico em comparação ao genótipo homocigoto selvagem.

O polimorfismo DBP-rs7041 associou-se a maior sobrevida no grupo de pacientes com pelo menos um alelo polimórfico (_/G = 66,5±6,0%) em 11 anos de seguimento, comparado ao homocigoto selvagem (T/T = 50,3±8,7%; P=0,0282; Figura 6A). Entretanto, para pacientes sem transplante (Figura 6B) e no grupo com transplante (Figura 6C) observou-se semelhança entre os referidos genótipos (P>0,05). O mesmo ocorreu para os polimorfismos DBP-rs4588 (Figura 7A a 7C) e CYP24A1-rs6013897 (Figura 8A a 8C) (P>0,05).

Tabela 11. Perfil de risco por análise de regressão logística em grupo total de pacientes e subgrupos para análise de vitamina D (GTotal e GTd = cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular – CHC), pacientes com cirrose e CHC (G1 e G1d), com cirrose isolada (G2 e G2d), comparado a indivíduos sem hepatopatias.

Covariantes	GTotal			G1			G2			G1 x G2		
	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	*Valor-P	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	*Valor-P	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	*Valor-P	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	*Valor-P
Tabagismo	2,05	1,16 – 3,63	0,0129	-	-	-	2,50	1,34 – 4,65	0,004	-	-	-
Etilismo	12,68	7,13 – 22,56	<0,0001	24,36	10,25 – 57,91	<0,0001	10,51	5,65 – 19,57	<0,0001	-	-	-
DM	11,11	4,58 – 26,97	<0,0001	15,27	4,53 – 51,47	<0,0001	10,04	3,85 – 26,17	<0,0001	-	-	-
HAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Idade	1,03	1,01 – 1,05	0,0031	1,08	1,04 – 1,12	<0,0001	-	-	-	1,08	1,03 – 1,13	0,0005
Sexo masculino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,36	1,17 – 9,59	0,0237
<i>DBP</i> -rs4588_/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>DBP</i> -rs7041_/G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>CYP24A1</i> -rs6013897_/T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,18	1,50 – 133,71	0,0205
Hepatites virais	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,09	1,22 – 7,81	0,0169
GGT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,85	1,40 – 10,58	0,009
AFP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,46	2,32 – 12,88	0,0001
Creatinina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,58	1,41 – 9,07	0,0071
Covariantes	GTd			G1d			G2d			G1d x G2d		
	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	*Valor-P	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	*Valor-P	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	*Valor-P	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	*Valor-P
Tabagismo	-	-	-	14,50	1,10 – 189,46	0,0414	-	-	-	-	-	-
Etilismo	21,68	2,56 – 183,21	0,0047	12,10	1,09 – 1,10	0,0421	-	-	-	-	-	-

*P=Nível de significância; DM=Diabetes mellitus; HAS=Hipertensão arterial sistêmica; *DBP*=*Vitamin D-binding protein*; *CYP24A1*=*Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1*; GGT= gama glutamil transferase, AFP= Alfa-fetoproteína, d= subgrupo de indivíduos com dosagem de vitamina D.

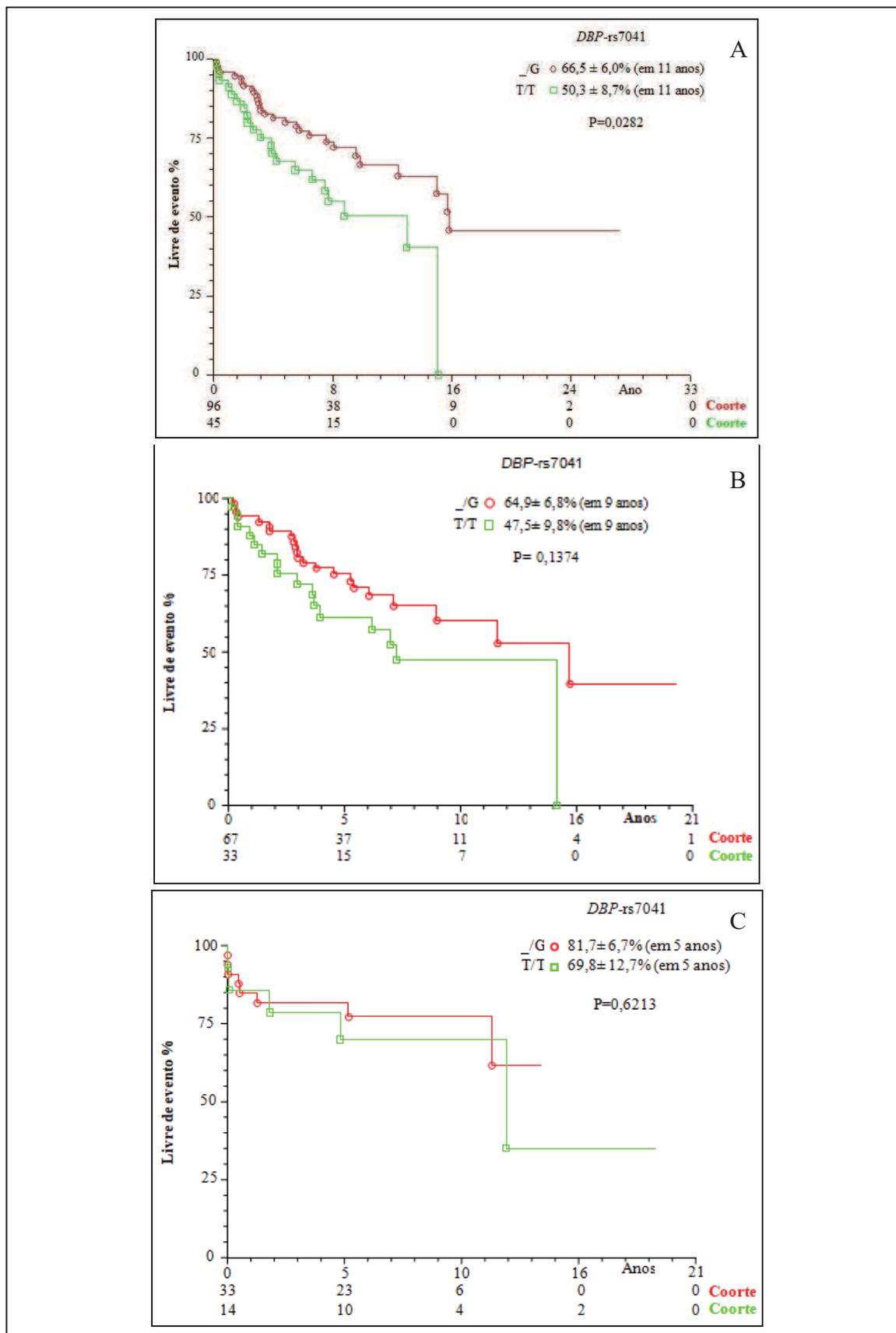


Figura 6. Curva atuarial de Kaplan-Meier para pacientes com cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular livres de evento morte, considerando o polimorfismo *DBP-rs7041* em: A- grupo total de pacientes (com e sem transplante); B- pacientes sem transplante; C- pacientes com transplante; portadores de genótipos com pelo menos um alelo polimórfico ($_ /G$), comparado ao genótipo homocigoto selvagem (T/T). *DBP*= *Vitamin D-binding protein*.

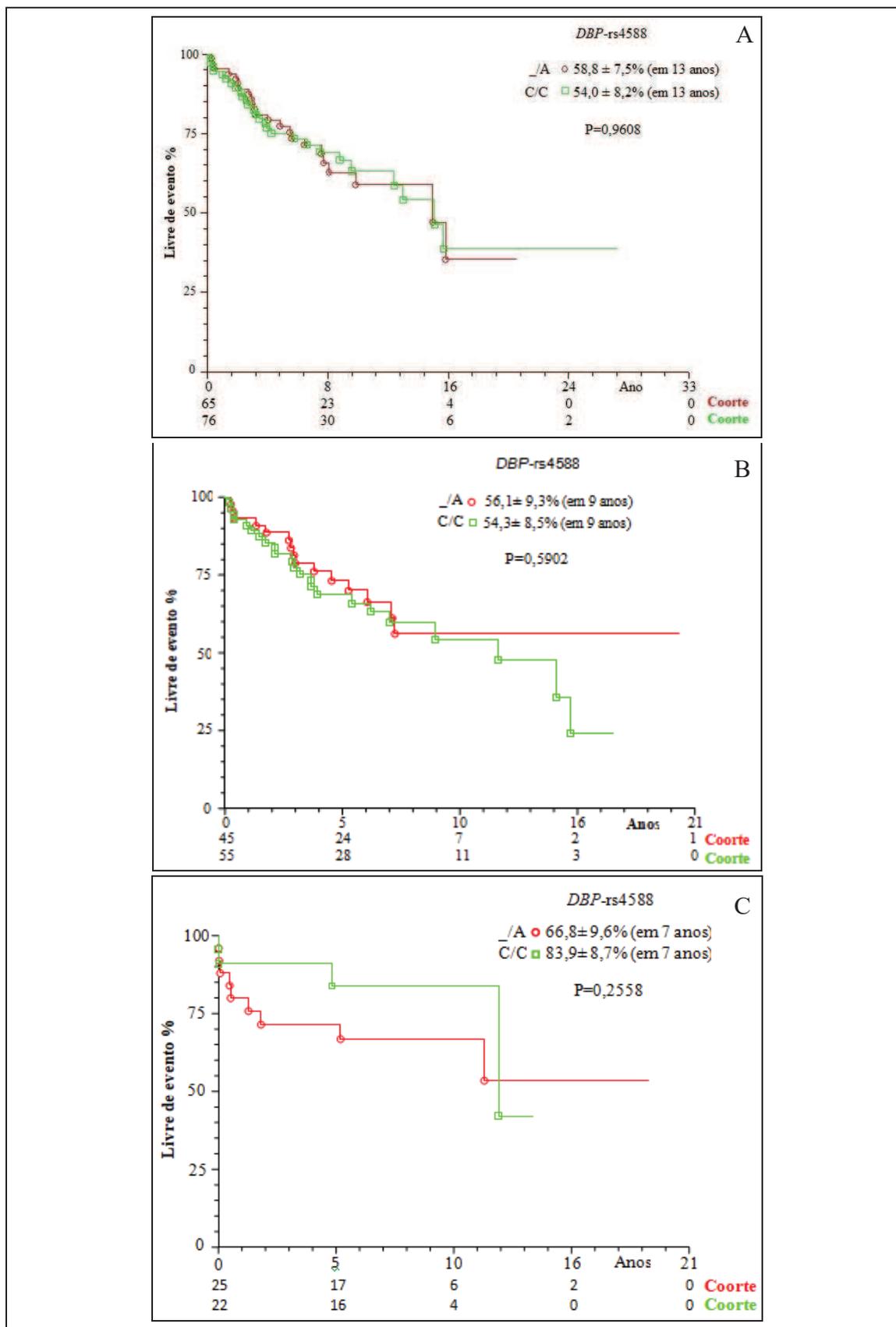


Figura 7. Curva atuarial de Kaplan-Meier para pacientes com cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular livres de evento morte, considerando o polimorfismo *DBP-rs4588* em: A- grupo total de pacientes (com e sem transplante); B- pacientes sem transplante; C- pacientes com transplante; portadores de genótipos com pelo menos um alelo polimórfico (_/A), comparado ao genótipo homocigoto selvagem (C/C). *DBP*= *Vitamin D-binding protein*.

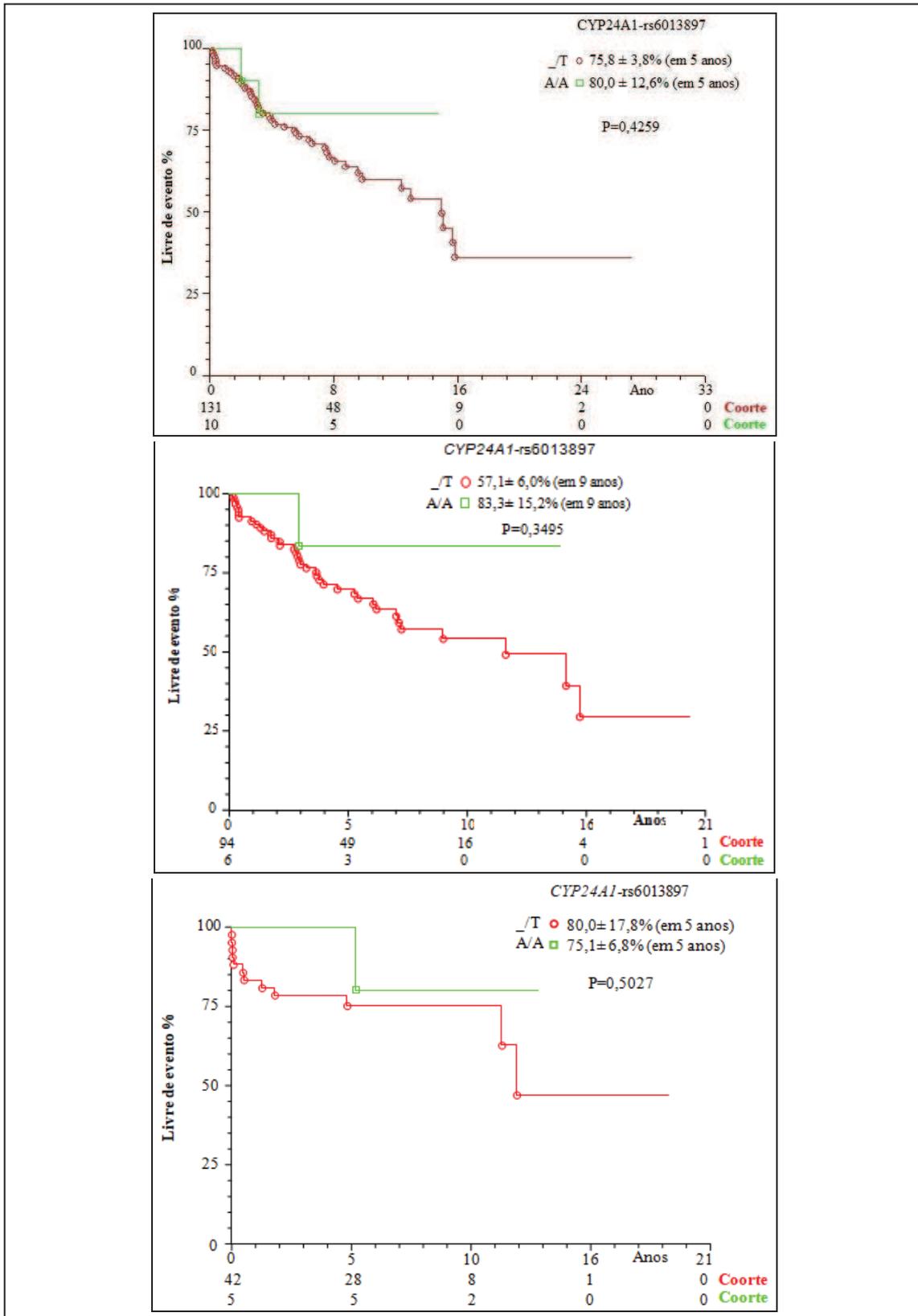


Figura 8. Curva atuarial de Kaplan-Meier para pacientes com cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular livres de evento morte, considerando o polimorfismo *CYP24A1*-rs6013897 em: A- grupo total de pacientes (com e sem transplante); B- pacientes sem transplante; C- pacientes com transplante; portadores de genótipos com pelo menos um alelo polimórfico ($_ / T$), comparado ao genótipo homocigoto selvagem (A/A). *CYP24A1*= *Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1*.

4. DISCUSSÃO

Foram estudados pacientes com cirrose com ou sem CHC considerando variantes genéticas de *DBP* e *CYP24A1*, envolvidos com transporte e metabolismo da vitamina D, abrangendo também aspectos demográficos e bioquímicos, assim como comorbidades e hábitos de vida. Destacaram-se entre os pacientes etilismo, tabagismo e DM⁹⁵, prevalecendo o sexo masculino⁹⁶. A análise de regressão logística mostrou os referidos fatores como de risco independente para cirrose com ou sem CHC^{97,98}, sendo etilismo e DM para ambas, e tabagismo particularmente na cirrose. Acrescenta-se para cirrose com CHC o avanço de idade e sexo masculino, corroborando, mas também discordante de outros estudos^{96,99}, bem como a presença de hepatites virais^{100,101} e nível sérico elevado de creatinina¹⁰².

Reconhecidamente, a ingestão de álcool em excesso aumenta a inflamação e o estresse oxidativo¹⁰⁰, provocando danos no tecido hepático com desenvolvimento de fibrose, cirrose e CHC¹⁰³, confirmado também neste estudo. O consumo de 80g/dL ou mais de álcool por dia durante 10 anos eleva a chance dessas hepatopatias¹⁶. Estudos mostram que etilismo está associado ao vício de tabaco e ambos se encontram frequentes em pacientes com cirrose e CHC, atuando em conjunto para o desenvolvimento da doença¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Com mais de 40 compostos ativos metabolizados pelo fígado, o uso do tabaco é potencial fator de risco por causar dano ao DNA e responsável, assim, pela hepatocarcinogênese^{100,107,108}.

Neste estudo, DM também se destacou nos pacientes. Esse distúrbio metabólico, problema de saúde público em nível global, confere risco para o desenvolvimento de doença hepato gordurosa não-alcoólica, cirrose e CHC^{100,105,106}. Além disso, a DM tipo 2 implica na resistência à insulina e hiperinsulinemia, que provoca inflamação,

proliferação celular, inibição da apoptose e mutação de genes supressores de tumores, também responsáveis para o desenvolvimento do câncer¹⁰⁹.

Por outro lado, houve semelhança entre pacientes e controles para HAS, que em outro estudo associou-se com cirrose hepática e CHC, relacionada com aumento da incidência e evolução de pior prognóstico¹¹⁰. No entanto, na cirrose, em relação à pressão vascular sistêmica, é importante considerar o acoplamento fisiopatológico entre insuficiência hepática e hipertensão portal, com o desenvolvimento de vasodilatação sistêmica e esplâncnica¹¹¹. Isso reflete em circulação hiperdinâmica geralmente presente nos pacientes com cirrose, caracterizada por aumento do débito cardíaco, aumento da frequência cardíaca e baixa resistência vascular sistêmica e baixa pressão arterial¹¹¹⁻¹¹⁵. Nesse contexto, vasodilatadores escapam à degradação pelo fígado lesado e, em excesso, desempenham papel na vasodilatação esplâncnica e sistêmica.

Na circulação sistêmica, a vasodilatação arterial ocasiona a redução do volume sanguíneo central, com hipovolemia fisiológica efetiva¹¹⁶. Apesar da ativação dos sistemas vasoconstritores endógenos, os pacientes apresentam hipotensão arterial, um marcador de disfunção circulatória¹¹⁷, em parte devido à redução da resposta vascular aos vasoconstritores^{118,119}. Desse modo, a hipertensão arterial raramente se manifesta em pacientes com cirrose. No entanto, ainda há controvérsia quanto à compreensão da regulação homeostática em pacientes com cirrose e hipertensão arterial. Isso provavelmente inclui a combinação de vasodilatação e vasoconstrição em paralelo¹¹¹.

Em relação às variantes genéticas, *DBP-rs4588* mostrou relevância no sexo feminino, com frequência reduzida do genótipo homozigoto selvagem (C/C) no grupo com cirrose e CHC, comparado a controles. Neste grupo de pacientes prevaleceram genótipos com pelo menos um alelo mutante (C/A), comparado a controles,

corroborando outro estudo¹²⁰, mas em casuística com hepatite por vírus C, independente do sexo. Além disso, mulheres com cirrose e CHC mostraram também maior frequência do alelo mutante (A), comparado à cirrose isolada e controles. Ressalta-se, a importância da análise de subgrupos de risco, cujos resultados ora apresentados devem ser confirmados em ampla casuística. Por outro lado, estudo de meta análise não detectou associação dos polimorfismos de *DBP* (rs4588 e rs7041) com risco para diversos tipos de câncer, incluindo CHC¹²¹.

Neste estudo, pacientes e controles mostraram semelhança na distribuição genotípica e alélica de *DBP*-7041, assim como em outras casuísticas^{44,121}. Por outro lado, há referência de associação do alelo mutante (G) com CHC¹²² que, no entanto, neste estudo conferiu acréscimo de sobrevida para o grupo total de pacientes, com ou sem transplante (grupo geral), comparado àqueles com genótipo selvagem (T/T), em 11 anos de seguimento, o que não ocorreu quando estratificados em transplantados e não transplantados. Em contrapartida, o referido polimorfismo associou-se à decréscimo de sobrevida em pacientes com câncer de pulmão ou doença renal^{123,124}. É notável a polêmica envolvendo os fatores genéticos e a fisiopatologia de doenças degenerativas, cuja escassez de estudos, assim como casuísticas reduzidas, é limitante na discussão e esclarecimento de mecanismos moleculares relacionados a vias metabólicas complexas.

Além disso, é possível que outros polimorfismos de *DBP*, além desses ora analisados, influenciem o risco de câncer. Destaca-se o efeito de variantes genéticas na estrutura e atividade de *DBP*^{24,45,53,54}, influenciando sua afinidade à vitamina D, assim como a concentração de 25(OH)D, como relatado para os polimorfismos de *DBP* rs7041 e rs4588⁶². A propósito, no presente estudo, constatou-se associação de nível reduzido de vitamina D com presença do alelo mutante de *DBP*-rs4588 ($_ / A$) em

pacientes com cirrose com ou sem CHC. Há referência, ainda, da influência dos polimorfismos de *DBP*-rs7041 e *DBP*-rs4588 afetando a afinidade de ligação de DBP com vitamina D, o que poderia influenciar conseqüentemente, sua atividade antitumorigênese⁶².

Adicionalmente, a ação de drogas pode influenciar também a expressão gênica de *DBP*, assim como o respectivo nível proteico¹²⁵. Desse modo, acredita-se que a medição da proteína circulante é biologicamente mais efetiva do que o papel de polimorfismos que podem explicar apenas parte desse mecanismo¹²². É importante considerar, ainda, a influência da fase aguda na regulação de genes específicos, cuja expressão é estimulada ou suprimida como resposta a estresse, inflamação, sepse e destruição tecidual¹²⁵. No entanto, variações genéticas nas diferentes etnias podem contribuir para divergências entre os estudos¹²².

Neste estudo, o polimorfismo *CYP24A1*-rs6013897 também se associou com cirrose e CHC, representado pelos genótipos com pelo menos um alelo mutante ($_ / T$). Nesse caso, apresentou-se como fator independente para a doença, enquanto o genótipo homocigoto selvagem (*A/A*) prevaleceu nos controles. Há referência de associação do polimorfismo *CYP24A1*-rs6013897 com câncer colorretal¹²⁶, além de reações inflamatórias⁷⁵. Entretanto, são escassos os estudos em cirrose com ou sem CHC e *CYP24A1*, o que é necessário esclarecer tendo em vista sua associação com reações inflamatórias⁷⁵.

Ressalta-se que a subfamília do citocromo P450 (*CYP24A1*) é uma enzima mitocondrial que age na hidroxilação dos carbonos 23 e 24 e apresenta-se envolvida na regulação da concentração de vitamina D^{28,72} e prevenção de doenças¹²⁷. A remoção do gene em camundongos mostrou níveis circulantes elevados de 1,25(OH)₂D₃ e

dificuldade na metabolização da vitamina D. Mutações nas regiões codificantes do gene, impedem a atividade da 24-hidroxilase e são responsáveis pela hipercalcemia¹²⁸.

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induz a expressão e é o principal regulador do excesso de CYP24A1, que por sua vez age da mesma forma quando os níveis circulantes da vitamina D ativa estão fisiologicamente ou patologicamente elevados^{19,128}. A atividade antiproliferativa benéfica da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pode afetar a expressão de *CYP24A1* durante o desenvolvimento tumoral. Isso indica que a inibição da atividade e expressão de *CYP24A1* é essencial para a prevenção eficaz²⁶.

O processo da hepatocarcinogênese é complexo e multifatorial, no qual o conjunto de interações genéticas e ambientais interfere influenciando o desenvolvimento do tumor. A análise de uma única variante genética pode ser incapaz de prever risco ou proteção. Assim, a identificação de um conjunto de polimorfismos ou haplótipos relacionados à doença poderiam esclarecer mecanismos moleculares envolvidos na hepatocarcinogênese¹²⁹.

A reconstrução de haplótipos para *DBP* em casos e controles mostrou semelhança entre pacientes e controles, indicando ausência de relação com risco ou proteção para a doença. Houve concordância com estudo de Azevedo et al. (2017)⁴⁴ em casuística com hepatite C crônica, cujos haplótipos não mostraram relação com risco para a doença. Adicionalmente, constatou-se também desequilíbrio de ligação (DL) para *DBP-rs4588-DBP-rs7041*, corroborando Mateos-Muños et al. (2016)¹²⁰ em casuística com hepatite C crônica, como também em mulheres brasileiras com síndrome do ovário policístico¹³⁰. A análise de haplótipos e DL implica em avaliar a associação não-aleatória de alelos em dois ou mais loci. Utilizada para entendimento de eventos evolutivos e demográficos passados, mapear genes associados com caracteres

quantitativos e doenças hereditárias, e entender a evolução de conjuntos de genes interligados¹³¹, além de medir o desvio da frequência haplotípica dos alelos na população¹³². Confirmou-se, ainda, EHW para todos os SNPs corroborando a literatura^{133,134}. Nesse caso, significa que frequências alélicas de uma população estão estáveis com o passar das gerações, sem impacto de fatores evolutivos, entre outros eventos, que podem alterar essas frequências¹³⁵.

Em relação ao perfil bioquímico, o grupo com cirrose e CHC, particularmente os homens, mostraram níveis séricos mais elevados de AST, GGT e AFP comparado ao grupo com cirrose isolada, o que pode acarretar pior prognóstico em diversos tipos de câncer¹³⁶. Níveis séricos elevados de AST e GGT, assim como de ALT, podem induzir a estresse oxidativo, lesão e ou esteatose hepática, sendo preditores de doença e mortalidade¹³⁷. Reconhecidamente, enzimas hepáticas do soro, em junção com bilirrubina e GGT, são marcadores preditivos para CHC e evolução da doença¹³⁶. Neste estudo, ressalta-se que além de níveis mais elevados de GGT nos pacientes com cirrose e CHC, como em outra casuística¹³⁸, esse grupo mostrou também maior frequência de valores alterados. Além disso, na análise de regressão logística GGT foi identificada como fator independente no agravamento da doença. A enzima GGT é um marcador sérico encontrado em células hepáticas e biliares. Nível sérico elevado associa-se ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças hepáticas, metabólicas, cardiovasculares e diabetes¹³⁹. Células tumorais sintetizam GGT, aumentando também, assim, os níveis séricos¹³⁸.

Utilizada amplamente no diagnóstico de câncer hepático, a AFP é considerada um importante marcador sorológico. Neste estudo, prevaleceram valores aumentados de AFP em pacientes com cirrose e CHC, comparado ao grupo com cirrose, corroborando

a literatura^{138,140}, apresentando-se também como fator independente para a doença. No entanto, aconselha-se a utilizar esse marcador apenas como método preventivo e não diagnóstico de CHC^{140,141}, tendo em vista que níveis elevados de AFP podem também ser encontrados na doença hepática crônica¹³⁸.

Valores elevados de bilirrubina presentes principalmente no grupo de homens com cirrose com ou sem CHC, se destacaram também em outro estudo como marcador para a disfunção hepática¹⁴². Ressalta-se que a síntese de vitamina D e bilirrubina no tecido hepático, embora ocorrendo independentemente, uma pode afetar a outra¹⁴³. Lee et al. (2019)¹⁴⁴ observaram deficiência nos níveis de vitamina D em crianças associada a nível sérico elevado de bilirrubina, sugerindo que o comprometimento da função excretora no fígado, prejudica a absorção da vitamina D no intestino¹⁴⁴. Por outro lado, a albumina, sintetizada no fígado e a principal proteína do plasma sanguíneo, mostrou níveis reduzidos em ambos os grupos de pacientes, confirmando sua associação com disfunção hepática¹⁴⁵. Isso poderia comprometer a via de transporte das formas 25(OH)D e 1,25(OH)₂D, que embora transportadas principalmente pela DBP, ligam-se também à albumina (10 a 15%), o que, entretanto, necessita esclarecimento.

A respeito da vitamina D, houve decréscimo de níveis séricos nos controles, comparado a pacientes, mas sem diferença significativa. Entretanto, outra casuística mostrou associação de níveis reduzidos de vitamina D com vários tipos de câncer¹⁴⁶. Além disso, em estudo de coorte associou-se deficiência da vitamina D a estágios avançados da doença e mortalidade¹⁴⁷. No presente estudo, cerca de 30% de pacientes e controles mostraram níveis séricos de vitamina D <30ng/mL. No entanto, é relatado que em torno de dois terços dos pacientes com CHC manifestam deficiência de vitamina

D, mostrando que níveis séricos têm correlação inversa com a progressão de doenças hepáticas¹⁴⁸⁻¹⁵¹.

Estudo epidemiológico brasileiro, da região sudeste do país, mostrou níveis reduzidos de vitamina D na população¹⁵². Fatores como latitude, baixa exposição solar e uso de protetor solar podem interferir nos níveis séricos de vitamina D. Ressalta-se, ainda, que a faixa etária de adultos jovens, representada em todos os grupos, em sua jornada profissional frequentam geralmente ambientes restritos com pouca exposição solar, contribuindo também para a variação nos níveis séricos de vitamina D. Entretanto, há limitações neste estudo que, além do tamanho amostral reduzido, embora tenha permitido a análise estatística entre os grupos, representa a população brasileira de etnia miscigenada^{153,154}, assim como a flutuação dos níveis de 25(OH)D₃ durante as estações do ano^{129,155}.

Neste estudo, correlacionou-se níveis de vitamina D e PTH. Reconhecidamente, mesmo em situações de deficiência de vitamina D, a forma ativa [1,25(OH)₂D] pode apresentar níveis satisfatórios sob mediação de PTH. Nesse caso, a hipovitaminose D ocasiona hipocalcemia que influencia a síntese de PTH, o qual estimula a expressão da 1- α -hidroxilase que participa da conversão de 25(OH)D na forma ativa^{28,71}. Desse modo, é possível que mesmo em quadros de deficiência de vitamina D, o calcitriol pode estar em quantidade aparentemente normal, às custas de PTH. Nesse processo, o PTH age sobre o osso para aumentar o influxo de cálcio e fosfato, com propósito de aumentar a síntese de vitamina D que, por sua vez, suprime a produção e secreção de PTH, encerrando o ciclo de feedback negativo¹⁵⁶.

Neste estudo, pacientes e controles mostraram semelhança nos níveis de PTH, corroborando outro estudo em câncer de mama¹⁵⁷. Por outro lado, vitamina D e PTH

apresentaram correlação positiva moderada apenas nos pacientes, enquanto em outra casuística¹⁵⁸ foi observada correlação negativa, sugerindo valores elevados de PTH em deficiência de vitamina D e vice-versa. Nesse contexto, ressalta-se que alterações genéticas em *DBP*, que participa ativamente da via metabólica de vitamina D, poderia influenciar seu nível sérico, com secreção compensatória de PTH em caso de deficiência de vitamina D²⁸. A propósito, este estudo mostrou maior frequência de níveis reduzidos de vitamina D em pacientes com cirrose com ou sem CHC portadores de pelo menos um alelo mutante ($_ / A$) para *DBP*-rs4588, comparado ao grupo controle, concordante com Santos et al. (2017)¹³⁰. Entretanto, indivíduos do grupo controle com níveis elevados de vitamina D mostraram também prevalência de genótipos com o alelo mutante, sugerindo que outros fatores influenciam os níveis de vitamina D, o que deve ser confirmado em casuísticas mais numerosas, incluindo outros fatores de risco.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Este estudo permite as seguintes conclusões.

1. Variantes genéticas da via da vitamina D, representadas pelos genótipos com o alelo mutante de *DBP*-rs4588, particularmente em mulheres, assim como, os genótipos com o alelo mutante de *CYP24A1*-rs6013897 associam-se com cirrose e CHC.

2. Os haplótipos de *DBP*-rs4588-rs7041, com semelhança entre pacientes de controles, não demonstram associação com cirrose com ou sem CHC.

3. Níveis séricos de vitamina D não diferenciam pacientes de controles, entretanto, há associação do polimorfismo *DBP*-rs4588 com níveis reduzidos de vitamina D em pacientes, e aumentados nos controles, sugerindo que outros fatores influenciam os níveis de vitamina D.

4. São relevantes como fatores independentes e possíveis preditores para cirrose com CHC etilismo, DM, avanço de idade, *CYP24A1*-rs6013897, GGT, AFP, creatinina e hepatites virais; enquanto tabagismo, etilismo e DM para cirrose isolada. Por outro lado, o polimorfismo *DBP*-rs7041 confere acréscimo de sobrevida para pacientes com cirrose com ou sem CHC, sugerindo seu caráter protetor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Li J, Wang Y, Ma M, Jiang S, Zhang X, Zhang Y, et al. Autocrine CTHRC1 activates hepatic stellate cells and promotes liver fibrosis by activating TGF- β signaling. *E Bio Medicine* 2019;pii:S2352-3964(19)30009-X.
- 2- Stasi C. Epidemiology of Liver Cirrhosis [Carta]. *J Clin Exp Hepatol* 2015;5(3):272.
- 3- Bingül İ, Başaran-Küçükgergin C, Aydın AF, Çoban J, Doğan-Ekici I, Doğru-Abbasoğlu S, et al. Betaine treatment decreased oxidative stress, inflammation, and stellate cell activation in rats with alcoholic liver fibrosis. *Environ Toxicol Pharmacol* 2016;45:170-8.
- 4- De la Garza RG, Morales-Garza LA, Martin-Estal I, Castilla-Cortazar I. Insulin-like growth factor-1 deficiency and cirrhosis establishment. *J Clin Med* 2017;9:233-47.
- 5- Marcellin P, Kutala BK. Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver Int* 2018;38(Suppl. 1):2–6.
- 6- Wong MCS, Huang J. The growing burden of liver cirrhosis: implications for preventive measures. *Hepatol Inter* 2018;12:201-3.
- 7- Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Compare Data Visualization. 2018. <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>
- 8- Bakiri L, Hamacher R, Graña O, Guío-Carrión A, Campos-Olivas R, Martinez L, et al. Liver carcinogenesis by FOS-dependent inflammation and cholesterol dysregulation. *J Exp Med* 2017;214(5):1387–1409.
- 9- Gomes MA, Priolli DG, Tralhão JG, Botelho MF. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. *Rev Assoc Med Bras* 2013;59(5).
- 10- Baitello MEL, Tenani GD, Ferreira RF, Nogueira V, Pinhel MAS, Silva RCMA, et al. VEGF Polymorphisms Related to Higher Serum Levels of Protein Identify Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2016;2016:9607054.
- 11- Harris PS, Hansen RM, Gray ME, Massoud OI, McGuire BM, Shoreibah MG. Hepatocellular carcinoma surveillance: An evidence-based approach. *World J Gastroenterol* 2019;25(13):1550–59.
- 12- Castán A, Navarro Y, Sarría L, Larrosa R, Serradilla M, Serrablo A. Radiological diagnosis of hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic patients. *Hepatoma Res* 2017;3:1-17.
- 13- Chedid MF, Kruel CRP, Pinto MA, Grezzana-Filho TJM, Leipnitz I, Kruel CDP, et al. Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis and Operative Management. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2017;30(4):272-8.

- 14- Xu B, Lv W, Li X, Zhang L, Lin J. Prognostic genes of hepatocellular carcinoma based on gene coexpression network analysis. *J Cell Biochem* 2019;1-8.
- 15- Pimenta JR, Massabki PS. Carcinoma hepatocelular: um panorama clínico. *Rev Bras Clin Med* 2010;8:59-67.
- 16- Bodzin AS, Busuttill RW. Hepatocellular carcinoma: Advances in diagnosis, management, and long term outcome. *World J Hepatol* 2015;7(9):1157-67.
- 17- World Health Organization (Who). Global Status Report alcohol and health - 2018. 2018; <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274603/9789241565639-eng.pdf?ua=1>
- 18- Yvamoto EY, Ferreira RF, Nogueira V, Pinhel MA, Tenani GD, Andrade JG, et al. Influence of vascular endothelial growth factor and alpha-fetoprotein on hepatocellular carcinoma. *Genet Mol Res* 2015;14(4):17453-62.
- 19- Hill TR, Granic A, Aspray TJ. Vitamin D and Ageing. *Subcell Biochem* 2018;90:191-220.
- 20- Molin A, Baudoin R, Kaufmann M, Souberbielle JC, Ryckewaert A, Vantuyghem MC, et al. CYP24A1 Mutations in a Cohort of Hypercalcemic Patients: Evidence for a Recessive Trait. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100(10):E1343-52.
- 21- Holick MF. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev* 2008;66(10 Supl 2):S182-94
- 22- Bikle DD, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad JG. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63(4):954-9.
- 23- Ma Y, Johnson CS, Trump DL. Mechanistic Insights of Vitamin D Anticancer Effects. *Vitam Horm* 2016;100:395-431.
- 24- Al-Daghri NM, Mohammed AK, Bukhari I, Rikli M, Abdi S, Ansari MGA, et al. Efficacy of vitamin D supplementation according to vitamin D-bindingprotein polymorphisms. *Nutrition* 2019;(63-64):148-54.
- 25- Mehramiz M, Khayyatzadeh SS, Esmaily H, Ghasemi F, Sadeghi-Ardekani K, Tayefi M, et al. Associations of vitamin D binding protein variants with the vitamin D-induced increase in serum 25-hydroxyvitamin D. *Clinical Nutrition ESPEN* 2019;(29):59-64.
- 26- Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007;7(9):684-700.

- 27- Datta P, Philipsen PA, Olsen P, Bogh MK, Johansen P, Schmedes AV, et al. The half-life of 25(OH)D after UVB exposure depends on gender and vitamin D receptor polymorphism but mainly on the start level. *Photochem Photobiol Sci* 2017;16(6):985-95.
- 28- Castro LC. The vitamin D endocrine system. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2011;55:566-75.
- 29- Shah I, Akhtar MK, Hisaindee S, Rauf MA, Sadig M, Ashraf SS. Clinical diagnostic tools for vitamin D assessment. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018;180:105-17.
- 30- Ferreira CES, Maeda SS, Batista MC, Lazaretti-Castro M, Vasconcelos LS, Madeira M, et al. Posicionamento Oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) e da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) – Intervalos de Referência da Vitamina D - 25(OH)D. *J Bras Patol Med Lab* 2017;53(6):377-81.
- 31- Holick MF. The death D-fying vitamin. *Mayo Clin Proc*. 2018;93:679-81.
- 32- Hariri M, Zohdi S. Effect of Vitamin D on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review of Randomized Controlled Clinical Trials. *Int J Prev Med* 2019;10:14.
- 33- El Baba K, Zantout MS, Akel R, Azar ST. Seasonal variation of vitamin D and HbA(1c) levels in patients with type 1 diabetes mellitus in the Middle East. *Int J Gen Med* 2011;4:635–8.
- 34- Baz-Hecht M, Goldfine AB. The impact of vitamin D deficiency on diabetes and cardiovascular risk. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010;17(2):113–9.
- 35- Ahn J, Park S, Zuniga B, Bera A, Song CS, Chatterjee B. Vitamin D in Prostate Cancer. *Vitam Horm* 2016;100:321-55.
- 36- van Schoor NM, Lips P. Worldwide vitamin D status. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25(4):671-80.
- 37- Hagenau T, Vest R, Gissel TN, Poulsen CS, Erlandsen M, Mosekilde L, et al. Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin pigmentation and latitude: an ecologic meta-regression analysis. *Osteoporos Int* 2009;20:133-40.
- 38- Peters BS, Verly E Jr, Marchioni DM, Fisberg M, Martini LA. The influence of breakfast and dairy products on dietary calcium and vitamin D intake in postpubertal adolescents and young adults. *J Hum Nutr Diet* 2012;25(1):69-74.
- 39- Maeda SS. Análise dos fatores determinantes para as concentrações de 25-hidroxivitamina D em diferentes populações da cidade de São Paulo: the São Paulo Vitamin D

Evaluatio Study (SPADES) [tese]. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo; 2010.

40- Premaor MO, Paludo P, Manica D, Paludo AP, Rossatto ER, Scalco R, et al. Hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in resident physicians of general hospital in Southern Brazil. *J Endocrinol Investigation* 2008;31(11):991-5.

41- Bandeira F, Griz L, Freese E, Lima DC, Thé AC, Diniz ET, et al. Vitamin D deficiency and its relationship with bone mineral density among postmenopausal women living in the tropics. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2010;54(2):227-32.

42- Silva BCC, Camargos BM, Fujii JB, Dias EP, Soares MMS. Prevalência de deficiência e insuficiência de vitamina D e sua correlação com PTH, marcadores de remodelação óssea e densidade mineral óssea em pacientes ambulatoriais. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008;52(3):482-8.

43- Janssens W, Bouillon R, Claes B, Carremans C, Lehouck A, Buysschaert I, et al. Vitamin D deficiency is highly prevalent in COPD and correlates with variants in the vitamin D-binding gene. *Thorax* 2010;65:215-20.

44- Azevedo LA, Matte U, Silveira TR, Bonfanti JW, Bruch JP, Álvares-da-Silva MR. Effect of Vitamin D Serum Levels and GC Gene Polymorphisms in Liver Fibrosis Due to Chronic Hepatitis C. *Ann Hepatol* 2017;16(5):742-8.

45- Yousefzadeh P, Shapses SA, Wang X. Vitamin D Binding Protein Impact on 25-Hydroxyvitamin D Levels under Different Physiologic and Pathologic Conditions. *Inter J Endocrinol* 2014:1-6.

46- Konstantakis C, Tselekouni P, Kalafateli M, Triantos C. Vitamin D deficiency in patients with liver cirrhosis. *Ann Gastroenterol* 2016;29(3):297-306.

47- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(7):1911-30.

48- Pludowski P, Grant WB, Bhattoa HP, Bayer M, Povoroznyuk V, Rudenka E, et al. Vitamin d status in central europe. *Int J Endocrinol* 2014;2014:589587.

49- Nielsen OH, Hansen TI, Gubatan JM, Jensen KB, Lars Rejnmark L. Managing vitamin D deficiency in inflammatory bowel disease. *Frontline Gastroenterology* 2019;1-7.

50- Jones KS, Assar S, Harnpanich D, Bouillon R, Lambrechts D, Prentice A, et al. 25(OH)D2 half-life is shorter than 25(OH)D3 half-life and is influenced by DBP concentration and genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(9):3373-81.

- 51- Powe CE, Ricciardi C, Berg AH, Erdenesanaa D, Collerone G, Ankers E, et al. Vitamin D-binding protein modifies the vitamin D-bone mineral density relationship. *J Bone Miner Res* 2011;26(7):1609-16.
- 52- Chun RF, Percy BE, Adams JS, Hewison M. Vitamin D binding protein and monocyte response to 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D: analysis by mathematical modeling. *PLoS One* 2012;7(1):e30773.
- 53- Sollid ST, Hutchinson MY, Berg V, Fuskevåg OM, Figenschau Y, Thorsby PM, et al. Effects of vitamin D binding protein phenotypes and vitamin D supplementation on serum total 25(OH)D and directly measured free 25(OH)D. *Eur J Endocrinol* 2016;174(4):445-52.
- 54- Abboud M, Rybchyn MS, Rizk R, Fraser DR, Mason RS. Sunlight exposure is just one of the factors which influence vitamin D status. *Photochem Photobiol Sci* 2017;16(3):302-13.
- 55- Hollis BW. Comparison of equilibrium and disequilibrium assay conditions for ergocalciferol, cholecalciferol and their major metabolites. *J Steroid Biochem* 1984;21:81-6.
- 56- Allegra S, Cusato J, De Francia S, Arduino A, Longo F, Pirro E, et al. Role of CYP24A1, VDR and GC gene polymorphisms on deferasirox pharmacokinetics and clinical outcomes. *Pharmacogenomics J* 2018;18(3):506-15.
- 57- Jorde R. The Role of Vitamin D Binding Protein, Total and Free 25-Hydroxyvitamin D in Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10:79.
- 58- Jassil NK, Sharma A, Bikle D, Wang X. Vitamin D Binding Protein and 25-Hydroxyvitamin D Levels: Emerging Clinical Applications. *Endocr Pract* 2017;23(5):605-13.
- 59- Peng J, Zhan YL, Liu YJ, Zong Y, Xu JG. Plasma VDBP, 25(OH)D, and GSH levels predict surgical outcome in patients with cervical spondylotic myelopathy. *Kaohsiung J Med Sci* 2019;35(2):102-10.
- 60- Chishimba L, Thickett DR, Stockley RA, Wood AM. The vitamin D axis in the lung: a key role for vitamin D-binding protein. *Thorax* 2010;65(5):456-62.
- 61- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;140(6):883-99.
- 62- Ying HQ, Sun HL, He BS, Pan YQ, Wang F, Deng QW, et al. Circulating vitamin D binding protein, total, free and bioavailable 25-hydroxyvitamin D and risk of colorectal cancer. *Scientific Reports* 2015;5:7956.
- 63- Weinstein SJ, Stolzenberg-Solomon RZ, Kopp W, Rager H, Virtamo J, Albanes D. Impact of circulating vitamin D binding protein levels on the association between 25-

hydroxyvitamin D and pancreatic cancer risk: a nested case-control study. *Cancer Res* 2012;72(5):1190-8.

64- Mondul AM, Weinstein SJ, Moy KA, Männistö S, Albanes D. Vitamin D-binding protein, circulating vitamin D and risk of renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 2014;134(11):2699-706.

65- Weinstein SJ, Mondul AM, Kopp W, Rager H, Virtamo J, Albanes D. Circulating 25-hydroxyvitamin D, vitamin D-binding protein and risk of prostate cancer. *Int J Cancer* 2013;132(12):2940-7.

66- Yoshida Y, Furukawa JI, Naito S, Higashino K, Numata Y, Shinohara Y. Identification of unique glycoisoforms of vitamin D-binding protein and haptoglobin as biomarker candidates in hepatocarcinogenesis of STAM mice. *Glycoconj J* 2018;35(5):467-76.

67- Lutsey PL, Michos ED, Misialek JR, Pankow JS, Loehr L, Selvin E, et al. Race and Vitamin D Binding Protein Gene Polymorphisms Modify the Association of 25-Hydroxyvitamin D and Incident Heart Failure: The ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) Study. *JACC Heart Fail* 2015;3(5):347-56.

68- Newton DA, Baatz JE, Kindy MS, Gattoni-Celli S, Shary JR, Hollis BW, et al. Vitamin D binding protein polymorphisms significantly impact vitamin D status in children. *Pediatric Research* 2019:1-7.

69- Veldurthy V, Wei R, Campbell M, Lupicki K, Dhawan P, Christakos S. 25-Hydroxyvitamin D₃ 24-Hydroxylase: A Key Regulator of 1,25(OH)₂D₃ Catabolism and Calcium Homeostasis. *Vitam Horm* 2016;100:137-50.

70- Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. *Arch Biochem Biophys* 2012;523(1):9-18.

71- Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev* 2016;96:365-408.

72- Basit S. Vitamin D in health and disease: a literature review. *Br J Biomed Sci* 2013;70(4):161-72.

73- Pike JW, Meyer MB, Benkusky NA, Lee SM, John HS, Carlson A, et al. Genomic Determinants of Vitamin D-Regulated Gene Expression. *Vitam Horm* 2015;100:21-44.

74- Gilbert R, Bonilla C, Metcalfe C, Lewis S, Evans DM, Fraser WD, et al. Associations of vitamin D pathway genes with circulating 25-hydroxyvitamin-D, 1,25-dihydroxyvitamin-D, and prostate cancer: a nested case-control study. *Cancer Causes Control* 2015;26(2):205-18.

- 75- Wang Y, Wang O, Li W, Ma L, Ping F, Chen L, et al. Variants in Vitamin D Binding Protein Gene Are Associated With Gestational Diabetes Mellitus. *Medicine (Baltimore)* 2015;94(40):e1693.
- 76- Dankers W, Colin EM, van Hamburg JP, Lubberts E. Vitamin D in autoimmunity: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Front Immunol* 2016;7:697.
- 77- Buonsenso D, Sali M, Pata D, Masiello E, Salerno G, Ceccarelli M, et al. Vitamin d levels in active tb, latent tb, non-tb pneumonia and healthy children: a prospective observational study. *Fetal Pediatr Pathol* 2018:1-11.
- 78- Mandal D, Reja AH, Biswas N, Bhattacharyya P, Patra PK, Bhattacharya B. Vitamin D receptor expression levels determine the severity and complexity of disease progression among leprosy reaction patients. *New Microbes New Infect* 2015;6:35-9.
- 79- Efe C, Kav T, Aydin C, Cengiz M, Imga NN, Purnak T, et al. Low serum vitamin D levels are associated with severe histological features and poor response to therapy in patients with autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 2014;59:3035-42.
- 80- Zuccotti E, Oliveri M, Girometta C, Ratto D, Di Iorio C, Occhinegro A, et al. Nutritional strategies for psoriasis: current scientific evidence in clinical trials. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22(23):8537-51.
- 81- Alhuzaim ON, Aljohani N. Effect of vitamin d3 on untreated graves' disease with vitamin d deficiency. *Clin Med Insights Case Rep* 2014;7:83-5.
- 82- Sherlock S, Dooley J. *Doenças do Fígado e do Sistema Biliar*. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.599.
- 83- Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011;53(3):1020-22.
- 84- Peng Y, Qi X, Guo X. Child-Pugh Versus MELD Score for the Assessment of Prognosis in Liver Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Medicine (Baltimore)* 2016;95(8):e2877.
- 85- Ohe MN, Santos RO, Kunii IS, Abrahão M, Cervantes O, Carvalho AB, et al. Utilidade da Medida de PTH Intra-Operatório no Tratamento Cirúrgico do Hiperparatiroidismo Primário e Secundário: Análise de 109 Casos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50(5):869-75.
- 86- Salazar LA, Hirata MH, Cavali SA, Machado MO, Hirata RD. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem* 1998;44:1748-50.
- 87- Bailey R, Cooper JD, Zeitels L, Smyth DJ, Yang JH, Walker NM, et al. Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes. *Diabetes* 2007;56:2616-21.

- 88- West R. Tobacco smoking: Health impact, prevalence, correlates and interventions. *Psychol Health* 2017;32(8):1018–36.
- 89- Sociedade Brasileira de Cardiologia, Malachias MVB, Souza WKSB, Plavnik FL, Rodrigues CIS, Brandão AA, et al. 7^a Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol* 2016;107(3)Supl 3:1-83.
- 90- Organização Oliveira JEP, Montenegro Junior RM, Vencio S. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. 2017; <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>
- 91- Guo S, Thompson E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992;48:361-72.
- 92- Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin version. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution. Bioinform Online* 2007;1:47-50.
- 93- Slatkin M, Excoffier L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity* 1996;76:377-83.
- 94- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21(2):263-5.
- 95- Singal AG, Manjunath H, Yopp AC, Beg MS, Marrero JA, Gopal P, et al. The effect of PNPLA3 on fibrosis progression and development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014;109:325-34.
- 96- Mak LY, Cruz-Ramon V, Chinchilla-Lopez P, Torres HA, LoConte NK, Rice JP, et al. Global epidemiology, prevention, and management of hepatocellular carcinoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2018:262-79.
- 97- Li X, Xu H, Gao P. Diabetes Mellitus is a Risk Factor for Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection in China. *Med Sci Monit* 2018;24:6729-34.
- 98- Sánchez-Jimenez BA, Brizuela-Alcantara D, Ramos-Ostos MH, Alva-Lopez LF, Uribe-Esquivel M, Chavez-Tapia NC. Both alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis association with cardiovascular risk and liver fibrosis. *Alcohol* 2018;69:63-7.
- 99- Cieslak KP, Baur O, Verheij J, Bennink RJ, van Gulik TM. Liver function declines with increased age. *HPB (Oxford)* 2016;18(8):691-6.
- 100- Tunissiolli NM, Castanhole-Nunes MMU, Biselli-Chicote PM, Pavarino EC, da Silva RF, da Silva RC, et al. Hepatocellular Carcinoma: a Comprehensive Review of

Biomarkers, Clinical Aspects, and Therapy. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017;18(4):863-72.

101- Frakes JM, Abuodeh YA, Naghavi AO, Echevarria MI, Shridhar R, Friedman M, et al. Viral hepatitis associated hepatocellular carcinoma outcomes with yttrium-90 radioembolization. *J Gastrointest Oncol* 2018;9(3):546–52.

102- Klavan HL, Fortune BE. Elevated Creatinine in a Patient With Cirrhosis. *Clinical Liver Disease* 2016;7(3):48-52.

103- Nguyen-Khac E, Thiele M, Voican C, Nahon P, Moreno C, Boursier J, et al. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis in patients with alcohol-related liver disease by transient elastography: an individual patient data meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2018;3:614-25.

104- European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of alcohol-related liver disease. *J Hepatol* 2018;69(1):154-81.

105- Hassan MM, Curley SA, Li D, Kaseb A, Davila M, Abdalla EK, et al. Association of diabetes duration and diabetes treatment with the risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2010;116:1938-46.

106- Raff EJ, Kakati D, Bloomer JR, Shoreibah M, Rasheed K, Singal AK. Diabetes mellitus predicts occurrence of cirrhosis and hepatocellular cancer in alcoholic liver and non-alcoholic fatty liver diseases. *J Clin Transl Hepatol* 2015;3:9-16.

107- Chen KM, Sun YW, Cooper TK, Benitez G, Aliaga C, Zhu J, et al. Comparative tumorigenicity and DNA damage induced by dibenzo[def,p]chrysene and its metabolites in the mouse ovary. *Chem Res Toxicol* 2018;31(11):1111-8.

108- Wienecke A, Kraywinkel K. [Tobacco-associated cancers in Germany-incidence and mortality trends since 1995]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2018; 61(11):1399-1406.

109- Hassan K, Bhalla V, Ezz El, Regal M, A-Kader HH. Nonalcoholic fatty liver disease: A comprehensive review of a growing epidemic. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 2015;20(34):12082-101.

110- Simon TG, King LY, Chong DQ, Nguyen LH, Ma Y, VoPham T, et al. Diabetes, metabolic comorbidities, and risk of hepatocellular carcinoma: Results from two prospective cohort studies. *Hepatology* 2018;67:1797-806.

111- Henriksen JH, Moller S. Liver cirrhosis and arterial hypertension. *World J Gastroenterol* 2006;12(5):678-85.

112- Møller S, Bendtsen F. The pathophysiology of arterial vasodilatation and hyperdynamic circulation in cirrhosis. *Liver International* 2018;38(4):570-80.

- 113- Møller S, Hobolth L, Winkler C, Bendtsen F, Christensen E. Determinants of the hyperdynamic circulation and central hypovolaemia in cirrhosis. *Gut* 2011; 60:1254-9.
- 114- Siniscalchi A, Aurini L, Spedicato S, Bernardi E, Zanoni A, Dante A et al. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: predictive factors and outcome following liver transplantation. *Minerva Anestesiol* 2013; 79(1):15-23.
- 115- Villanueva C, Albillos A, Genesca J, Abraldes JG, Calleja JL, Aracil C et al. Development of hyperdynamic circulation and response to beta -blockers in compensated cirrhosis with portal hypertension. *Hepatology* 2016; 63(1):197-206.
- 116- Lenz K. Hepatorenal syndrome--is it central hypovolemia, a cardiac disease, or part of gradually developing multiorgan dysfunction? *Hepatology* 2005; 42(2):263 -265.
- 117- Gomez EV, Gonzalez AT, Bertot LC, Garcia AY, Rodriguez YS, Perez YM. Arterial Blood Pressure Is Closely Related to Ascites Development in Compensated HCV-Related Cirrhosis. *PLoS One* 2014;9(4):e95736.
- 118- Møller S, Bendtsen F, Henriksen JH. Determinants of the renin -angiotensin -aldosterone system in cirrhosis with special emphasis on the central blood volume. *Scand J Gastroenterol* 2006;41:451-8.
- 119- Jimenez W, Rodes J. Impaired responsiveness to endogenous vasoconstrictors and endothelium - derived vasoactive factors in cirrhosis. *Gastroenterology* 1994;107:1201-3.
- 120- Mateos-Muñoz B, Garcia-Martín E, Torrejón MJ, Devesa-Medina MJ, Esguevillas G, Cárdenas MC, et al. GC Gene Polymorphism and Unbound Serum Retinol-Binding Protein 4 are related to the risk of Insulin Resistance in Patients with Chronic Hepatitis C: A prospective cross-sectional study. *Medicine (Baltimore)* 2016;95(10):e3019.
- 121- Tagliabue E, Raimondi S, Gandini S. Meta-analysis of vitamin D-binding protein and cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015;24(11):1758-65.
- 122- Peng Q, Yang S, Lao X, Li R, Chen Z, Wang J, et al. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in VDR and DBP Genes with HBV-Related Hepatocellular Carcinoma Risk in a Chinese Population. *PLoS One* 2014;9(12):e116026.
- 123- Grzegorzewska AE, Świdarska MK, Mostowska A, Warchoń W, Jagodziński PP. Polymorphisms of Vitamin D Signaling Pathway Genes and Calcium-Sensing Receptor Gene in respect to Survival of Hemodialysis Patients: A Prospective Observational Study. *Int J Endocrinol* 2016;2016:2383216.
- 124- Akiba T, Morikawa T, Odaka M, Nakada T, Kamiya N, Yamashita M, et al. Vitamin D Supplementation and Survival of Patients with Non-small Cell Lung Cancer: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clin Cancer Res* 2018;24(17):4089-97.

- 125- Guha C, Osawa M, Werner PA, Galbraith RM, Paddock GV. Regulation of human Gc (vitamin D-binding) protein levels: hormonal and cytokine control of gene expression in vitro. *Hepatology* 1995;21(6):1675-81.
- 126- Vidigal VM, Silva TD, de Oliveira J, Pimenta CAM, Felipe AV, Forones NM. Genetic polymorphisms of vitamin D receptor (VDR), CYP27B1 and CYP24A1 genes and the risk of colorectal cancer. *Int J Biol Markers* 2017;32(2):e224-e230.
- 127- Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Sabir MS, Khan Z, Sandoval R, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D and Klotho: A Tale of Two Renal Hormones Coming of Age. *Vitam Horm* 2016;100:165-230.
- 128- Pike JW, Meyer MB. Regulation of mouse Cyp24a1 expression via promoter-proximal and downstream-distal enhancers highlights new concepts of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) action. *Arch Biochem Biophys*. 2012;523(1):2-8.
- 129- Hung CH, Chiu YC, Hu TH, Chen CH, Lu SN, Huang CM, et al. Significance of vitamin d receptor gene polymorphisms for risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Transl Oncol* 2014;7:503-7.
- 130 - Santos BR, Lecke SB, Spritzer PM. Genetic variant in vitamin D-binding protein is associated with metabolic syndrome and lower 25-hydroxyvitamin D levels in polycystic ovary syndrome: A cross-sectional study. *PLoS One* 2017;12(3):e0173695.
- 131- Slatkin M. Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet* 2008;9:477-85.
- 132- Chen L, Guo Y, Xiao C, Wu W, Lan Q, Fang Y, et al. Genetic polymorphisms and forensic efficiency of 19 X-chromosomal STR loci for Xinjiang Mongolian population. *PeerJ* 2018;6:e5117.
- 133- Jorde R, Schirmer H, Wilsgaard T, Joakimsen RM, Mathiesen EB, Njølstad I, et al. Polymorphisms Related to the Serum 25-Hydroxyvitamin D Level and Risk of Myocardial Infarction, Diabetes, Cancer and Mortality. The Tromsø Study. *PLoS One*. 2012;7(5):e37295.
- 134- Nissen J, Rasmussen LB, Ravn-Haren G, Andersen EW, Hansen B, Andersen R, et al. Common variants in CYP2R1 and GC genes predict vitamin D concentrations in healthy Danish children and adults. *PLoS One*. 2014;9(2):e89907.
- 135- Aguilar PO, Frías JR. Aplicación de la genética de poblaciones en el ámbito de la medicina. *Biomédica* 2014;34:171-9.
- 136- Zhang C, Wang H, Ning Z, Xu L, Zhuang L, Wang P, et al. Serum liver enzymes serve as prognostic factors in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncotargets Ther* 2017;10:1441-9.

- 137- van Beek JH, de Moor MH, de Geus EJ, Lubke GH, Vink JM, Willemsen G, et al. The genetic architecture of liver enzyme levels: GGT, ALT and AST. *Behav Genet* 2013;43:329-39.
- 138- Yang JG, He XF, Huang B, Zhang HA, He YK. Rule of changes in serum GGT levels and GGT/ALT and AST/ALT ratios in primary hepatic carcinoma patients with different AFP levels. *Cancer Biomark* 2018;21:743-6.
- 139- Praetorius Bjork M, Johansson B. Gamma-Glutamyltransferase (GGT) as a biomarker of cognitive decline at the end of life: contrasting age and time to death trajectories. *Int Psychogeriatr* 2018;30:981-90.
- 140- Giannini EG, Trevisani F. Accuracy of alpha-fetoprotein measurement in detection of hepatocellular carcinoma--1 more nail in the coffin. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12:2138-9.
- 141- Giannini EG, Savarino V. Predicting the posttransplant prognosis of patients with hepatocellular carcinoma: what lies beneath alpha-fetoprotein? *Liver Transpl* 2013;19:1166-7.
- 142- Nielsen K, Clemmesen JO, Vassiliadis E, Vainer B. Liver collagen in cirrhosis correlates with portal hypertension and liver dysfunction. *APMIS*. 2014;122:1213-22.
- 143- Mehrpisheh S, Memarian A, Mahyar A, Valiahdi NS. Correlation between serum vitamin D level and neonatal indirect hyperbilirubinemia. *BMC Pediatr* 2018;18(1):178.
- 144- Lee WS, Jalaludin MY, Wong SY, Ong SY, Foo HW, Ng RT. Vitamin D non-sufficiency is prevalent in children with chronic liver disease in a tropical country. *Pediatr Neonatol* 2019;60(1):12-18.
- 145- Jalan R, Schnurr K, Mookerjee RP, Sen S, Cheshire L, Hodges S, et al. Alterations in the functional capacity of albumin in patients with decompensated cirrhosis is associated with increased mortality. *Hepatology* 2009;50:555-64.
- 146- Calmarza P, Sanz Paris A, Prieto Lopez C, Llorente Barrio M, Boj Carceller D. [Vitamin D levels in patients with recent cancer diagnosis]. *Nutr Hosp* 2018;35(4):903-8.
- 147- Finkelmeier F, Kronenberger B, Koberle V, Bojunga J, Zeuzem S, Trojan J, et al. Severe 25-hydroxyvitamin D deficiency identifies a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma - a prospective cohort study. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;39:1204-12.
- 148- Piotrowska A, Wierzbicka J, Nadkarni S, Brown G, Kutner A, Zmijewski MA. Antiproliferative Activity of Double Point Modified Analogs of 1,25-Dihydroxyvitamin D(2) Against Human Malignant Melanoma Cell Lines. *Int J Mol Sci* 2016;17(1).pii:E76.

- 149- Garcia-Martin E, Agundez JA, Maestro ML, Suarez A, Vidaurreta M, Martinez C, et al. Influence of vitamin D-related gene polymorphisms (CYP27B and VDR) on the response to interferon/ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *PLoS One* 2013;8:e74764.
- 150- Pontoriero AC, Trinks J, Hulaniuk ML, Caputo M, Fortuny L, Pratz LB, et al. Influence of ethnicity on the distribution of genetic polymorphisms associated with risk of chronic liver disease in South American populations. *BMC Genet* 2015;16:93.
- 151- Zhao XY, Li J, Wang JH, Habib S, Wei W, Sun SJ, et al. Vitamin D serum level is associated with Child-Pugh score and metabolic enzyme imbalances, but not viral load in chronic hepatitis B patients. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e3926.
- 152- Pereira-Santos M, Santos J, Carvalho GQ, Santos DBD, Oliveira AM. Epidemiology of vitamin D insufficiency and deficiency in a population in a sunny country: Geospatial meta-analysis in Brazil. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018;1-8.
- 153- Beiguelman B. Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. 2, ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 1996.
- 154- Pena SDJ. Dossiê raça, genética, identidades e saúde: Razões para banir o conceito de raça da medicina brasileira. Rio de Janeiro: História, Ciências, Saúde – Manguinhos 2005;12:321-46.
- 155- Sonderman JS, Munro HM, Blot WJ, Signorello LB. Reproducibility of serum 25-hydroxyvitamin d and vitamin D-binding protein levels over time in a prospective cohort study of black and white adults. *Am J Epidemiol* 2012;176:615-21
- 156- John GB, Cheng CY, Kuro-o M. Role of Klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD. *Am J Kidney Dis* 2011;58:127-34.
- 157- Almquist M, Bondeson AG, Bondeson L, Malm J, Manjer J. Serum levels of vitamin D, PTH and calcium and breast cancer risk-a prospective nested case-control study. *Int J Cancer* 2010;127:2159-68.
- 158- Martins JS, Palhares MO, Teixeira OCM, Ramos MG. Vitamin D Status and Its Association with Parathyroid Hormone Concentration in Brazilians. *J Nutrition Metabol* 2017;28(2):1-5.

APÊNDICE I – Distribuição de subgrupos de pacientes com cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular e indivíduos sem hepatopatias (controles), considerando dosagem sérica de vitamina D, paratormônio (PTH), assim como genótipos com um alelo mutante para polimorfismos de *DBP* (*Vitamin D-binding protein*) e *CYP24A1* (*Cytochrome P450 family 24 subfamily A member*).

Indivíduo	Sexo	Idade anos	Vitamina D ng/mL	Valor PTH pg/mL	DBP-rs4588 /A	DBP-rs7041 /G	CYP24A1-rs6013867 /T
1 Pac	M	58	39,09	61,84	N	S	S
2 Pac	M	62	49,59	32,83	S	N	S
3 Pac	F	55	36,02	102,90	N	S	N
4 Pac	M	33	33,70	46,91	S	N	S
5 Pac	M	57	43,98	82,67	N	S	S
6 Pac	M	41	35,88	28,42	S	N	S
7 Pac	M	52	23,62	24,28	N	S	S
8 Pac	M	56	65,10	172,00	S	S	S
9 Pac	M	49	63,42	28,57	S	S	S
10 Pac	F	64	36,99	45,82	N	S	S
11 Pac	M	60	58,05	41,53	S	N	S
12 Pac	M	61	8,58	35,91	S	N	S
13 Pac	F	57	30,06	48,71	S	S	N
14 Pac	M	55	19,10	17,41	S	S	S
15 Pac	F	58	18,40	16,70	S	S	S
16 Pac	M	53	54,69	22,39	S	N	S
17 Pac	M	64	45,98	24,79	N	S	S
18 Pac	M	57	65,2	214,6	N	S	S
19 Pac	F	74	28,32	59,2	S	S	S
20 Pac	M	49	22,32	41,25	S	N	N
21 Pac	M	64	21,30	44,21	N	S	S
22 Pac	M	52	49,33	36,3	S	N	S
23 Pac	F	66	38,6	26,58	S	S	S
1 Cont	M	49	35,20	37,90	N	S	S
2 Cont	M	62	20,75	63,70	S	N	S
3 Cont	M	67	22,64	50,14	N	S	S
4 Cont	M	54	41,04	41,54	N	S	S
5 Cont	F	65	42,78	76,78	N	S	S
6 Cont	M	49	24,56	29,45	S	N	S
7 Cont	M	53	50,59	41,91	S	N	S
8 Cont	M	55	42,08	58,14	N	S	S
9 Cont	F	73	28,05	20,28	S	N	S
10 Cont	M	61	19,52	37,58	S	N	S
11 Cont	F	54	27,51	42,29	S	S	S

Continua

Indivíduo	Sexo	Idade anos	Vitamina D ng/mL	Valor PTH pg/mL	DBP-rs4588 /A	DBP-rs7041 /G	CYP24A1-rs6013867 /T
12 Cont	M	60	21,47	35,96	S	S	S
13 Cont	M	66	26,61	85,04	N	S	S
14 Cont	M	49	14,63	61,19	S	N	S
15 Cont	F	62	23,64	64,75	S	S	S
16 Cont	M	64	29,09	30,39	N	S	S
17 Cont	F	74	23,51	65,85	S	S	S
18 Cont	M	65	42,21	49,85	N	S	S
19 Cont	M	57	32,93	54,02	N	S	S
20 Cont	M	67	18,19	44,02	S	S	S

Pac= Paciente; Cont= Controle; M= sexo masculino; F= sexo feminino; PTH= paratormônio; DBP (*Vitamin D-binding protein*) e CYP24A1 (*Cytochrome P450 family 24 subfamily A member*); N= Não; S= Sim; _/A, _/G e _/T= genótipos com pelo menos um alelo de risco.

APÊNDICE II - Artigo

Polimorfismos Genéticos Relacionados à Via da Vitamina D em Pacientes com Cirrose com ou sem Carcinoma Hepatocelular

Beatriz J Brait¹, Simone PS Lima¹, Franciana L Aguiar¹, Camila IF Oliveira-Brancati², Joyce AML Ferraz², Graciele D Tenani¹, Rafael Fernandes-Ferreira³, Marcela AS Pinhel¹, Leticia CP Assoni¹, Augusto H Nakahara⁴, Natalia S Jábali⁴, Octavio FP Costa⁴, Maria EL Baitello², Sidney Pinheiro Júnior^{2,5}, Renato F Silva^{1,6}, Rita CMA Silva^{1,6}, Doroteia RS Souza^{1,2,5}.

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-FAMERP, SP, Brasil. Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – Vila São Pedro. São José do Rio Preto, SP, Brasil, CEP: 15090-000

2 Núcleo de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular-FAMERP, SP, Brasil.

3 Universidade Estadual de Campinas - Unicamp

Cidade Universitária Zeferino Vaz - Barão Geraldo, Campinas - SP, Brasil, CEP:13083-970

4 Graduando do curso de medicina-FAMERP, SP, Brasil

5 Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular-FAMERP, SP, Brasil

6 Hospital de Base-FAMERP, SP, Brasil.

Titulo em execução:

DBP and CYP24A1 polymorphisms in cirrhosis and CHC

Declaração de conflito de interesse: Não há conflitos de interesse para declarar.

Autor Correspondente:

Beatriz de Jesus Brait

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – Vila São Pedro

São José do Rio Preto SP/Brazil/ CEP: 15090-000

Email: bia_brait@hotmail.com

RESUMO

Objetivo: Avaliar associação de polimorfismos genéticos da proteína transportadora da vitamina D (*DBP*-rs4588 e *DBP*-rs7041) e do citocromo P450 família 24 subfamília A membro 1 (*CYP24A1*-rs6013897), em pacientes com cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular (CHC), assim como perfil-demográfico/clínico/bioquímico, incluindo níveis séricos de vitamina D, além de sobrevida. **Métodos:** Foram estudados 383 indivíduos, incluindo Grupo Total de pacientes (GTotal: N=158) com cirrose com ou sem CHC, distribuídos em Grupo 1 (G1): 60 com cirrose e CHC (46 a 81 anos) e Grupo 2 (G2): 98 com cirrose isolada (16 a 71 anos), e o grupo controle sem hepatopatias (G3: N=225 - 20 a 84 anos). Os polimorfismos genéticos foram analisados por PCR (*polymerase chain reaction*) em tempo real. Admitiu-se erro α de 5%. **Resultados** – Prevaleceu sexo masculino, particularmente em G1 ($P<0,05$). Tabagismo, etilismo e diabetes mellitus (DM) destacaram-se em pacientes ($P<0,0001$). Para *DBP*-rs4588 e *DBP*-rs7041 todos os grupos apresentaram semelhança ($P>0,05$). Para *CYP24A1*-rs6013897 o genótipo com pelo menos um alelo polimórfico ($_ / T$) predominou em G1 (98,3%) versus G2 (88,8%; $P=0,0309$). Observou-se desequilíbrio de ligação para rs4588-rs7041 em pacientes e controles ($P=0,00000$). Houve semelhança haplotípica entre grupos ($P>0,05$). Níveis séricos de vitamina D e paratormônio (PTH) foram semelhantes entre subgrupos de pacientes (N=30) e controles (N=20) ($P>0,05$). Observou-se correlação positiva moderada entre vitamina D e PTH nos pacientes (GTotal: $R^2=0,3273$). Destacaram-se como fatores independentes para cirrose tabagismo, etilismo e diabetes mellitus (DM), assim como para cirrose com CHC, exceto o tabagismo, acrescentando-se também, nesse caso, avanço da idade, sexo masculino, alelo polimórfico de *CYP24A1*-rs6013897 ($_ / T$), hepatites virais e níveis

séricos alterados de gama glutamil transpeptidase (GGT), alfa fetoproteína (AFP) e creatinina. Observou-se aumento de sobrevida na presença do alelo polimórfico de *DBP-rs7041* ($P=0,0282$). **Conclusão** – Polimorfismo *CYP24A1-rs6013897* associa-se com cirrose e CHC, confirmando como preditores etilismo, DM, avanço de idade, *CYP24A1-rs6013897*, GGT, AFP, creatinina e hepatites virais; enquanto tabagismo, etilismo e DM para cirrose isolada. Polimorfismo *DBP-rs4588* associa-se com níveis reduzidos de vitamina D em pacientes, enquanto *DBP-rs7041* confere maior sobrevida para pacientes com cirrose com ou sem CHC.

Palavras-Chave: Fígado, Polimorfismo de nucleotídeo único, Neoplasia, Vitamina D.

Introdução

Cirrose é uma doença hepática crônica irreversível que se caracteriza por fibrose, várias lesões estruturais hepáticas¹ e formação de nódulos regenerativos². Representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade³, no entanto, sua prevalência é subestimada, pois muitos pacientes permanecem assintomáticos⁴. De acordo com o *Institute for Health Metrics and Evaluation* (IHME) da Universidade de Washington, em 2017, a cirrose e outras doenças crônicas do fígado destacaram-se como a décima causa de morte no mundo (2,36% do total de mortes)⁵.

Ressalta-se que a cirrose está diretamente associada ao desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (CHC)^{1,3}, presente em 90% dos casos desse tipo tumoral^{6,7}. O CHC, representa a principal neoplasia primária do fígado^{8,9} com alta taxa de mortalidade¹⁰, sendo a terceira causa mais comum de morte relacionado ao câncer no mundo, com 692 mil casos por ano⁴.

Reconhecidamente, eventos biomoleculares que desencadeiam a carcinogênese

hepática podem resultar de alterações que interferem na síntese de ácido desoxirribunucleico (DNA) como a cirrose e infecção viral (VHB e VHC)¹¹. Além disso, ressalta-se o papel da vitamina D, reconhecida por manter a homeostase do cálcio, imunomodulação e pelo poder inibitório no câncer¹². Acrescenta-se, ainda, sua participação como modulador da proliferação celular. Desse modo, a vitamina D vem sendo alvo de diversos estudos, devido aos seus benefícios à saúde e a possível prevenção de doenças crônicas, como o câncer¹³.

O gene da proteína transportadora da vitamina D (*DBP*) participa também de inúmeras funções nas vias metabólicas e biológicas, destacando-se a regulação do desenvolvimento ósseo, incluindo captura de actina, e modulação de respostas imunes^{14,15,16,17}. Por ser sintetizada no fígado, os pacientes com deficiência hepática como cirrose e CHC apresentam concentrações séricas reduzidas de *DBP*^{17,18}. As combinações alélicas e fenotípicas do gene mostram variações nas concentrações séricas entre as etnias^{19,20}. Nesse caso, as variantes genéticas *DBP*-rs4588 e *DBP*-rs7041, associam-se com níveis séricos reduzidos de 25(OH)D^{20,21} podendo apresentar consequências clínicas^{21,22}, o que necessita esclarecimento para cirrose e CHC.

O gene do citocromo P450 da família 24, subfamília A, membro 1 (*CYP24A1*) codifica a 25-hidroxivitamina D₃-24-hidroxilase. Essa enzima catalisa a conversão de 25(OH)D₃ e 1,25(OH)₂D₃ em produtos hidroxilados, que constituem a degradação da molécula de vitamina D²³. Adicionalmente, o aumento da expressão de *CYP24A1* e atividade da respectiva enzima 24-hidroxilase associa-se com a degradação de 25(OH)D₃ em 24,25(OH)₂D₃, o que pode estar relacionado com alteração do nível sérico de 25(OH)D₃¹⁷. Ressalta-se que a vitamina D, na sua forma ativa 1,25(OH)₂D, regula vários genes incluindo o efector chave de seu catabolismo, o *CYP24A1*²⁴

relacionado ao câncer de próstata²⁵, cuja expressão apresenta-se aumentada nos pacientes em estágio avançado da doença²⁶. Além disso, variantes genéticas de *CYP24A1* (rs6013897) associam-se a reações inflamatórias²⁷, o que deve ser esclarecido nas hepatopatias.

Desse modo, este estudo teve como objetivo avaliar a associação de polimorfismos genéticos da proteína de ligação da vitamina D (*DBP*-rs4588 e *DBP*-rs7041) e do citocromo P450 família 24 subfamília A membro 1 (*CYP24A1*-rs6013897) na cirrose com ou sem CHC, considerando perfil demográfico-clínico-bioquímico, assim como hábitos de vida e sobrevida.

Métodos

Foram estudados 383 indivíduos, distribuídos em: Grupo Total (GTotal) = 158, sendo subdivididos em Grupo 1 (G1) = 60 (46 a 81 anos) com diagnóstico de cirrose com CHC; Grupo 2 (G2) = 98 (16 a 71 anos) com cirrose isolada, acompanhados no Serviço de Transplante de Fígado e Instituto do Câncer de Gastroenterologia do Hospital de Base/Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-HB/FAMERP, e 225 indivíduos sem doenças hepáticas (grupo controle – G3; 20 a 84 anos) selecionados no Hemocentro – HB/FAMERP e por voluntários sem evidências clínicas e laboratoriais (níveis séricos de aspartato aminotransferase – AST, alanina aminotransferase – ALT, gama-glutamiltransferase - GGT) que confirmaram a ausência de doenças hepáticas. Os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CEP/FAMERP; Processo número 435/2011 e 6910/2011).

Incluíram-se como critérios de exclusão doenças correlacionadas a níveis séricos reduzidos de vitamina D, como diabetes tipo 1, doença de Crohn, tuberculose^{28,29}, hanseníase³⁰, esclerose múltipla, hepatite autoimune³¹, psoríase³², doença de Graves³³, e o uso de suplementos vitamínicos com vitamina D.

O diagnóstico de cirrose foi realizado pela combinação de critérios clínicos (fígado reduzido de volume, superfície irregular e consistência aumentada, esplenomegalia e sinais periféricos de hepatopatia crônica e hipertensão portal); laboratoriais (plaquetopenia, hipoalbuminemia e distúrbios da coagulação) e imagenológicos (fígado reduzido de volume, superfície irregular, sinais de hipertensão portal) presentes na doença, e por biópsia, quando necessário³⁴.

O diagnóstico de CHC foi realizado de acordo com as diretrizes de prática da *American Association for the Study of Liver Disease* (AASLD), que incluem exames de imagem (tomografia computadorizada, ressonância magnética), sorologia de alfafetoproteína (AFP) e biópsia, indicada por nódulos hepáticos de diâmetro ≤ 1 cm, e/ou diagnóstico por imagem inconclusivo³⁵. O grau de estadiamento para cirrose e CHC foi classificado pelos métodos de Child-Pugh e MELD (*Model for End-Stage Liver Disease*), ambos usados para classificar a prioridade dos pacientes para o transplante de fígado³⁶.

Dados sobre comorbidades (hipertensão arterial sistêmica - HAS e diabetes mellitus - DM), hábitos de vida (tabagismo e etilismo) e perfil demográfico (sexo e idade), bioquímico (AST, ALT, GGT, alfafetoproteína - AFP, bilirrubina e albumina) foram obtidos por questionário, prontuário médico eletrônico ou físico e protocolos pré-estabelecidos para seguimento de rotina dos pacientes nos referidos serviços.

Todos os participantes foram submetidos a coleta de uma amostra de sangue

periférico (5 mL) em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), para extração de DNA genômico. Para dosagem sérica de vitamina D e paratormônio (PTH) foram coletados 5 mL de sangue em tubo seco, realizado no Laboratório Central do complexo HB/FAMERP, com subgrupos constituídos: GTd = 30 pacientes do grupo total, sendo 4 com cirrose e CHC (G1d), e 26 com cirrose isolada (G2d); e G3d = 20 indivíduos do grupo controle sem hepatopatias. Considerou-se valores alterados para vitamina D, níveis séricos <30 ng/mL³⁷ e para PTH <15 e >65 ng/mL³⁸.

Após a extração de DNA genômico³⁹ os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) dos genes *DBP*-rs4588 (C__8278879_10), *DBP*-rs7041 (C__3133594_30) e *CYP24A1*-rs6013897 (C__29958084_10) foram genotipados com ensaios *TaqMan*[®] por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, realizada em volume final de 5 µL de amostra em cada um dos 96 poços da placa, composta pela mistura de 1,375 µL de água Depc (dietil pirocarbonato), 2,5 µL *TaqMan*[®] *Genotyping Master Mix* (Applied Biosystems - Thermo ScientificTM), 0,125 µL da Sonda *TaqMan*[®] SNP *Genotyping Assays* para cada polimorfismo e 1 µL de DNA diluído. As reações para amplificação dos segmentos polimórficos foram conduzidas às seguintes termociclagens: 95°C por 10 minutos, seguido de 47 ciclos a 92 °C por 15 segundos cada e 60 °C por 1 minuto, no equipamento StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A análise dos alelos foi realizada pelo programa StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems).

Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado foi aplicado para analisar variáveis qualitativas, incluindo frequências genotípicas e alélicas, sexo, distribuição de valores alterados para perfil bioquímico, comorbidades, hábitos de vida. Teste-t ou Mann-Whitney foi utilizado na análise de variáveis quantitativas (idade e perfil bioquímico) no programa *GraphPad Prism* (versão 5.0). Curva atuarial (Kaplan-Meier) de sobrevida

foi analisada considerando pelo menos um alelo polimórfico, assim como, análise de regressão logística (StatsDirect Statistal Analysis). Para os SNP foram analisados o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) e desequilíbrio de ligação (DL) pelo programa Arlequin v. 3.11^{40,41}, além de diferenças nas frequências haplotípicas entre os grupos pelo programa GraphPadPism (versão 5.0). Admitiu-se nível de significância para valor $P < 0,05$.

Resultados

Houve prevalência do sexo masculino em todos os grupos, destacando-se em pacientes com cirrose e CHC (G1) em comparação ao grupo com cirrose (G2; $P = 0,0002$) e G3 ($P = 0,0018$). Tabagismo, etilismo e DM prevaleceram em pacientes comparado a controles ($P < 0,0001$; Tabela 1). Observou-se equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os SNPs, em pacientes e controles ($P > 0,05$). Com relação ao perfil genético, para *DBP*-rs4588 e *DBP*-rs7041, houve semelhança entre os grupos em todas as comparações para distribuição genotípica e alélica ($P > 0,05$). Para *CYP24A1*-rs6013897, o genótipo com pelo menos um alelo polimórfico ($_ / T$) predominou em G1 (98,3%) versus G2 (88,8%; $P = 0,0309$).

A análise de desequilíbrio de ligação (LD) mostrou significância de rs4588-rs7041 em pacientes e controles ($P = 0,00000$, para ambos). Os haplótipos foram reconstruídos para o conjunto de SNPs de *DBP* (rs4588 e rs7041) e comparados entre GTotal e G3, sem diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

Houve semelhança para níveis séricos de vitamina D e PTH. No entanto, vitamina D mostrou decréscimo, e PTH acréscimo, respectivamente, em controle comparado ao grupo de pacientes. Valores alterados para vitamina D ($< 30\text{ng/mL}$),

correspondeu a 30% dos pacientes (GTd) e 35% dos indivíduos sem hepatopatias (G3d), e para PTH (<15 ou >65ng/m) 16,7% e 15%, respectivamente, com semelhança entre os grupos ($P>0,05$).

De acordo com os níveis plasmáticos alterados e recomendados de vitamina D, houve maior prevalência de alelos mutantes ($_ / A$) para *DBP*-rs4588 associado a níveis reduzidos de vitamina D no GTotal (77,8%) comparado ao G3 (14,3%; $P=0,0406$).

Houve correlação positiva moderada em pacientes com cirrose com ou sem CHC ($R^2= 0,3273$) entre valores séricos de vitamina D e PTH, no entanto, o mesmo não foi observado em controles ($R^2= 0,0106$).

Destacaram-se como fatores independentes para G2 o tabagismo, etilismo e diabetes mellitus (DM) Para G1, destacaram-se etilismo, DM avanço da idade, sexo masculino, alelo polimórfico de *CYP24A1*-rs6013897 ($_ / T$), hepatites virais e níveis séricos alterados de gama glutamil transpeptidase (GGT), alfa fetoproteína (AFP) e creatinina, comparado ao G2 (Tabela 2).

O polimorfismo *DBP*-rs7041 destacou maior sobrevida no grupo de pacientes com pelo menos um alelo polimórfico ($_ / G = 66,5\pm 6,0\%$) em 11 anos de seguimento, comparado ao homocigoto selvagem ($T/T = 50,3\pm 8,7\%$; $P=0,0282$). *DBP*-rs4588 também mostrou acréscimo na sobrevida em portadores de genótipos com pelo menos um alelo polimórfico em 13 anos de seguimento, assim como *CYP24A1*-rs6013897 para o genótipo homocigoto selvagem em 5 anos de seguimento, porém sem diferença significativa para ambos ($P>0,05$; Figura 1 e 2).

Discussão

Foram estudados pacientes com cirrose com ou sem CHC considerando variantes genéticas de *DBP* e *CYP24A1*, envolvidos com transporte e metabolismo da vitamina D, abrangendo também aspectos demográficos e bioquímicos, assim como comorbidades e hábitos de vida. Destacaram-se entre os pacientes etilismo, tabagismo e DM⁴², prevalecendo o sexo masculino⁴³. A análise de regressão logística mostrou os referidos fatores como de risco independente para cirrose com ou sem CHC^{44,45}, sendo etilismo e DM para ambas, e tabagismo particularmente na cirrose. Acrescenta-se para cirrose com CHC o avanço de idade e sexo masculino, corroborando, mas também discordando, de outros estudos^{43,46}. A presença de hepatites virais^{47,48} e nível sérico elevado de creatinina⁴⁹ em pacientes com CHC também foi observada neste estudo.

Reconhecidamente, a ingestão de álcool em excesso aumenta a inflamação e o estresse oxidativo⁴⁷, provocando danos no tecido hepático com desenvolvimento de fibrose, cirrose e CHC⁵⁰, confirmado também neste estudo. Estudos mostram que etilismo está associado ao vício de tabaco e ambos se encontram frequentes em pacientes com cirrose e CHC, atuando em conjunto para o desenvolvimento da doença⁵¹⁻⁵³, sendo potencial fator de risco por causar dano ao DNA e responsável, assim, pela hepatocarcinogênese^{47,54,55}.

Neste estudo, DM também se destacou nos pacientes. Esse distúrbio metabólico, problema de saúde público em nível global, confere risco para o desenvolvimento de doença hepato gordurosa não-alcoólica, cirrose e CHC^{47,51,52}. Além disso, a DM tipo 2 implica na resistência à insulina e hiperinsulinemia, provocando inflamação, proliferação celular, inibição da apoptose e mutação de genes supressores de tumores, também responsáveis para o desenvolvimento do câncer⁵⁶.

Confirmou-se, ainda, EHW para todos os SNPs corroborando a literatura^{57,58}. Constatou-se também, desequilíbrio de ligação (DL) para *DBP*-rs4588-*DBP*-rs7041, corroborando Mateos-Muñoz et al. (2016)⁵⁹ em casuística com hepatite C crônica, como também em mulheres brasileiras com síndrome do ovário poliscístico⁶⁰. A reconstrução de haplótipos para *DBP* mostrou semelhança entre pacientes e controles, indicando ausência de relação com risco ou proteção para a doença, concordando com estudo de Azevedo et al. (2017)⁶¹ em casuística com hepatite C crônica.

Neste estudo, pacientes e controles mostraram semelhança na distribuição genotípica e alélica de *DBP*-rs4588 e *DBP*-7041, assim como em outras casuísticas^{61,62}. Por outro lado, há referência de associação do alelo mutante de *DBP*-7041 (G) com CHC⁶³ que, no entanto, neste estudo conferiu aumento de sobrevida em pacientes com cirrose com ou sem CHC, comparado àqueles com genótipo selvagem (T/T), em 11 anos de seguimento. Todavia, o referido polimorfismo associou-se à decréscimo de sobrevida em pacientes com câncer de pulmão ou doença renal^{64,65}.

Destaca-se o efeito de variantes genéticas na estrutura e atividade de *DBP*^{19,20,22}, influenciando sua afinidade à vitamina D, assim como a concentração de 25(OH)D, como relatado para os polimorfismos de *DBP* rs7041 e rs4588⁶⁶. A propósito, no presente estudo, constatou-se associação de nível reduzido de vitamina D com presença do alelo mutante de *DBP*-rs4588 (G/A) em pacientes com cirrose com ou sem CHC⁶⁰. Há referência, ainda, de sua influência reduzindo a função de *DBP* e, conseqüentemente, sua atividade antitumorigênese⁶⁶. No entanto, variações genéticas nas diferentes etnias podem contribuir para divergências entre os estudos⁶³.

Neste estudo, o polimorfismo *CYP24A1*-rs6013897 também se associou com cirrose e CHC, representado pelos genótipos com pelo menos um alelo mutante (G/T).

Nesse caso, apresentou-se como fator independente para a doença, enquanto o genótipo homozigoto selvagem (A/A) prevaleceu nos controles. Há referência de associação do polimorfismo *CYP24A1*-rs6013897 com câncer colorretal⁶⁷, além de reações inflamatórias, entretanto, são escassos os estudos em cirrose com ou sem CHC²⁷.

Na análise de regressão logística GGT foi identificada como fator independente no agravamento do CHC. A enzima GGT é um marcador sérico encontrado em células hepáticas e biliares. Nível sérico elevado associa-se ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças hepáticas, metabólicas, cardiovasculares e diabetes⁶⁸.

Utilizada amplamente no diagnóstico de câncer hepático, a AFP é considerada um importante marcador sorológico. Neste estudo, prevaleceram valores aumentados de AFP em pacientes com cirrose e CHC, comparado ao grupo com cirrose, corroborando a literatura^{69,70}, apresentando-se também como fator independente para a doença. No entanto, aconselha-se utilizar esse marcador apenas como método preventivo e não diagnóstico de CHC^{69,71}, tendo em vista que níveis elevados de AFP podem também ser encontrados na doença hepática crônica⁷⁰.

A respeito da vitamina D, houve decréscimo de níveis séricos nos controles, comparado a pacientes, mas sem diferença significativa. Entretanto, outra casuística mostrou associação de níveis reduzidos de vitamina D com vários tipos de câncer⁷². Além disso, em estudo de coorte associou-se deficiência da vitamina D a estágios avançados da doença e mortalidade⁷³. No presente estudo, cerca de 30% de pacientes e controles mostraram níveis séricos de vitamina D <30ng/mL. No entanto, é relatado que em torno de dois terços dos pacientes com CHC manifestam deficiência de vitamina D, mostrando que níveis séricos têm correlação inversa com a progressão de doenças hepáticas⁷⁴⁻⁷⁷.

Estudo epidemiológico brasileiro, da região sudeste do país, mostrou níveis reduzidos de vitamina D na população⁷⁸. Entretanto, a população brasileira de etnia miscigenada e a flutuação dos níveis de 25(OH)D₃ durante as estações do ano devem ser consideradas⁷⁹⁻⁸², assim como no presente estudo.

Neste estudo, correlacionou-se níveis de vitamina D e PTH. Reconhecidamente, mesmo em situações de deficiência de vitamina D, a forma ativa [1,25(OH)₂D] pode apresentar níveis satisfatórios sob mediação de PTH^{83,84}. Nesse processo, o PTH age sobre o osso para aumentar o influxo de cálcio e fosfato, com propósito de aumentar a síntese de vitamina D que, por sua vez, suprime a produção e secreção de PTH, encerrando o ciclo de feedback negativo⁸⁵.

Neste estudo, pacientes e controles mostraram semelhança nos níveis de PTH, corroborando outro estudo em câncer de mama⁸⁶. Por outro lado, vitamina D e PTH apresentaram correlação positiva moderada apenas nos pacientes, enquanto em outra casuística⁸⁷ foi observada correlação negativa, sugerindo valores elevados de PTH em deficiência de vitamina D e vice-versa. Nesse contexto, ressalta-se que alterações genéticas em *DBP*, que participa ativamente da via metabólica de vitamina D, poderia influenciar seu nível sérico, com secreção compensatória de PTH em caso de deficiência de vitamina D⁸⁴.

Em conclusão, polimorfismo de CYP24A1-rs6013897 associa-se com cirrose e CHC, destacando-se também como possíveis preditores etilismo, DM, avanço de idade, GGT, AFP, creatinina e hepatites virais; enquanto tabagismo, etilismo e DM para cirrose isolada. Polimorfismo DBP-rs4588 associa-se com níveis reduzidos de vitamina D em pacientes enquanto DBP-rs7041 confere aumento de sobrevida para pacientes com cirrose com ou sem CHC.

Referências

- 1- Li J, Wang Y, Ma M, et al (2019). Autocrine CTHRC1 activates hepatic stellate cells and promotes liver fibrosis by activating TGF- β signaling. *E Bio Medicine*, pii:S2352-3964(19)30009-X.
- 2- De la Garza RG, Morales-Garza LA, Martin-Estal I, et al (2017). Insulin-like growth factor-1 deficiency and cirrhosis establishment. *J Clin Med*,**9**:233-47.
- 3- Wong MCS, Huang J (2018). The growing burden of liver cirrhosis: implications for preventive measures. *Hepatol Inter*,**12**,201-3.
- 4- Marcellin P, Kutala BK (2018). Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver Int*,**38**,2–6.
- 5- Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME) (2018). GBD Compare Data Visualization.
- 6- Baitello MEL, Tenani GD, Ferreira RF, et al (2016). VEGF Polymorphisms Related to Higher Serum Levels of Protein Identify Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Can J Gastroenterol Hepatol*,**2016**,9607054.
- 7- Harris PS, Hansen RM, Gray ME, et al (2019). Hepatocellular carcinoma surveillance: An evidence-based approach. *World J Gastroenterol*,**25**,1550-59.
- 8- Castán A, Navarro Y, Sarría L, et al(2017).Radiological diagnosis of hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic patients. *Hepatoma Res*,**3**:1-17.
- 9- Chedid MF, Krueel CRP, Pinto MA, et al (2017). Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis and Operative Management. *Arq Bras Cir Dig*,**30**, 272-8.
- 10- Xu B, Lv W, Li X, Zhang L, Lin J (2019). Prognostic genes of hepatocellular carcinoma based on gene coexpression network analysis. *J Cell Biochem*,1-8.
- 11- Yvamoto EY, Ferreira RF, Nogueira V, et al (2015). Influence of vascular endothelial growth factor and alpha-fetoprotein on hepatocellular carcinoma. *Genet Mol Res*,**14**,17453-62.
- 12- Hill TR, Granic A, Aspray TJ (2018). Vitamin D and Ageing. *Subcell Biochem*,**90**,191-220.
- 13- Molin A, Baudoin R, Kaufmann M, et al (2015). CYP24A1 Mutations in a Cohort of Hypercalcemic Patients: Evidence for a Recessive Trait. *J Clin Endocrinol Metab*,**100**,E1343-52.
- 14- Allegra S, Cusato J, De Francia S, et al (2018). Role of CYP24A1, VDR and GC gene polymorphisms on deferasirox pharmacokinetics and clinical outcomes. *Pharmacogenomics J*,**18**,506-15.
- 15- Jassil NK, Sharma A, Bikle D, Wang X (2017). Vitamin D Binding Protein and 25-Hydroxyvitamin D Levels: Emerging Clinical Applications. *Endocr Pract*,**23**,605-13.
- 16- Peng J, Zhan YL, Liu YJ, Zong Y, Xu JG (2019). Plasma VDBP, 25(OH)D, and GSH levels predict surgical outcome in patients with cervical spondylotic myelopathy. *Kaohsiung J Med Sci*,**35**,102-10.
- 17- Jorde R (2019). The Role of Vitamin D Binding Protein, Total and Free 25-Hydroxyvitamin D in Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*,**10**,79.
- 18- Yoshida Y, Furukawa JI, Naito S, et al (2018). Identification of unique glycoisoforms of vitamin D-binding protein and haptoglobin as biomarker candidates in hepatocarcinogenesis of STAM mice. *Glycoconj J*,**35**,467-76.

- 19- Sollid ST, Hutchinson MY, Berg V, et al (2016). Effects of vitamin D binding protein phenotypes and vitamin D supplementation on serum total 25(OH)D and directly measured free 25(OH)D. *Eur J Endocrinol*,**174**,445-52.
- 20- Abboud M, Rybchyn MS, Rizk R, Fraser DR, Mason RS (2017). Sunlight exposure is just one of the factors which influence vitamin D status. *Photochem Photobiol Sci*,**16**,302-13.
- 21- Newton DA, Baatz JE, Kindy MS, et al (2019). Vitamin D binding protein polymorphisms significantly impact vitamin D status in children. *Pediatric Research*,1-7.
- 22- Al-Daghri NM, Mohammed AK, Bukhari I, et al (2019). Efficacy of vitamin D supplementation according to vitamin D-bindingprotein polymorphisms. *Nutrition*,**63**,148-54.
- 23- Jones G, Prosser DE, Kaufmann M (2012). 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. *Arch Biochem Biophys*,**523**,9-18.
- 24- Pike JW, Meyer MB, Benkusky NA, et al (2015). Genomic Determinants of Vitamin D-Regulated Gene Expression. *Vitam Horm*,**100**:21–44.
- 25- Gilbert R, Bonilla C, Metcalfe C, et al (2015). Associations of vitamin D pathway genes with circulating 25-hydroxyvitamin-D, 1,25-dihydroxyvitamin-D, and prostate cancer: a nested case-control study. *Cancer Causes Control*,**26**,205-18.
- 26- Ahn J, Park S, Zuniga B, et al (2016). Vitamin D in Prostate Cancer. *Vitam Horm*,**100**,321-55.
- 27- Wang Y, Wang O, Li W, et al (2015). Variants in Vitamin D Binding Protein Gene Are Associated With Gestational Diabetes Mellitus. *Medicine (Baltimore)*,**94**,e1693.
- 28- Dankers W, Colin EM, van Hamburg JP, et al (2016). Vitamin D in Autoimmunity: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Front Immunol*,**7**, 697.
- 29- Buonsenso D, Sali M, Pata D, et al (2018). Vitamin D Levels in Active TB, Latent TB, Non-TB Pneumonia and Healthy Children: A Prospective Observational Study. *Fetal Pediatr Pathol*,1-11.
- 30- Mandal D, Reja AH, Biswas N, et al (2015). Vitamin D receptor expression levels determine the severity and complexity of disease progression among leprosy reaction patients. *New Microbes New Infect*,**6**,35-9.
- 31- Efe C, Kav T, Aydin C, et al (2014). Low serum vitamin D levels are associated with severe histological features and poor response to therapy in patients with autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci*,**59**, 3035-42.
- 32- Zuccotti E, Oliveri M, Girometta C, et al (2018). Nutritional strategies for psoriasis: current scientific evidence in clinical trials. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*,**22**,8537-51.
- 33- Alhuzaim ON, Aljohani N (2014). Effect of vitamin d3 on untreated graves' disease with vitamin d deficiency. *Clin Med Insights Case Rep*,**7**,83-5.
- 34- Sherlock S DJ (2004). Doenças do Fígado e do Sistema Biliar.In Eds 599.
- 35- Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver D (2011). Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*,**53**, 1020-2.
- 36- Peng Y, Qi X, Guo X (2016). Child-Pugh Versus MELD Score for the Assessment of Prognosis in Liver Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Medicine (Baltimore)*,**95**,e2877.
- 37- Holick MF (2018). The death D-fying vitamin. *Mayo Clin Proc*,**93**,679-81.

- 38- Ohe MN, Santos RO, Kunii IS, et al (2006). Utilidade da Medida de PTH Intra-Operatório no Tratamento Cirúrgico do Hiperparatiroidismo Primário e Secundário: Análise de 109 Casos. *Arq Bras Endocrinol Metab*,**50**,869-75.
- 39- Salazar LA, Hirata MH, Cavali SA, Machado MO, Hirata RD (1998). Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem*,**44**,1748-50.
- 40- Slatkin M, Excoffier L (1996). Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity*,**76**,377-83.
- 41- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2007). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*,**1**, 47-50.
- 42- Singal AG, Manjunath H, Yopp AC, et al (2014). The effect of PNPLA3 on fibrosis progression and development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*,**109**,325-34.
- 43- Mak LY, Cruz-Ramon V, Chinchilla-Lopez P, et al (2018). Global epidemiology, prevention, and management of hepatocellular carcinoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*,262-79.
- 44- Li X, Xu H, Gao P (2018). Diabetes Mellitus is a Risk Factor for Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection in China. *Med Sci Monit*,**24**,6729-34.
- 45- Sanchez-Jimenez BA, Brizuela-Alcantara D, Ramos-Ostos MH, et al (2018). Both alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis association with cardiovascular risk and liver fibrosis. *Alcohol*,**69**, 63-7.
- 46- Cieslak KP, Baur O, Verheij J, Bennink RJ, van Gulik TM (2016). Liver function declines with increased age. *HPB (Oxford)*,**18**,691-6.
- 47- Tunissiolli NM, Castanhole-Nunes MMU, Biselli-Chicote PM, et al (2017). Hepatocellular Carcinoma: a Comprehensive Review of Biomarkers, Clinical Aspects, and Therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*,**18**,863-72.
- 48- Frakes JM, Abuodeh YA, Naghavi AO, et al (2018). Viral hepatitis associated hepatocellular carcinoma outcomes with yttrium-90 radioembolization. *J Gastrointest Oncol*,**9**,546-52.
- 49- Klavan HL, Fortune BE (2016). Elevated Creatinine in a Patient With Cirrhosis. *Clinical Liver Disease*,**7**,48-52.
- 50- Nguyen-Khac E, Thiele M, Voican C, et al (2018). Non-invasive diagnosis of liver fibrosis in patients with alcohol-related liver disease by transient elastography: an individual patient data meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*,**3**, 614-25.
- 51- Hassan MM, Curley SA, Li D, et al (2010). Association of diabetes duration and diabetes treatment with the risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer*,**116**, 1938-46.
- 52- Raff EJ, Kakati D, Bloomer JR, et al (2015). Diabetes Mellitus Predicts Occurrence of Cirrhosis and Hepatocellular Cancer in Alcoholic Liver and Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. *J Clin Transl Hepatol*,**3**, 9-16.
- 53- European Association for the Study of the Liver (2018). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of alcohol-related liver disease. *J Hepatol*,**69**,154-81.
- 54- Chen KM, Sun YW, Cooper TK, et al (2018). Comparative tumorigenicity and DNA damage induced by dibenzo[def,p]chrysene and its metabolites in the mouse ovary. *Chem Res Toxicol*,**31**,1111-8.

- 55- Wienecke A, Kraywinkel K (2018). [Tobacco-associated cancers in Germany-incidence and mortality trends since 1995]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*.
- 56- Hassan K, Bhalla V, Ezz El, Regal M, A-Kader HH (2015). Nonalcoholic fatty liver disease: A comprehensive review of a growing epidemic. *World Journal of Gastroenterology: WJG*,**20**,12082-101.
- 57- Jorde R, Schirmer H, Wilsgaard T, et al (2012). Polymorphisms Related to the Serum 25-Hydroxyvitamin D Level and Risk of Myocardial Infarction, Diabetes, Cancer and Mortality. The Tromsø Study. *PLoS One*,**7**,e37295.
- 58- Nissen J, Rasmussen LB, Ravn-Haren G, et al (2014). Common variants in CYP2R1 and GC genes predict vitamin D concentrations in healthy Danish children and adults. *PLoS One*,**9**,e89907.
- 59- Mateos-Muñoz B, Garcia-Martín E, Torrejón MJ, et al (2016). GC Gene Polymorphism and Unbound Serum Retinol-Binding Protein 4 are related to the risk of Insulin Resistance in Patients with Chronic Hepatitis C: A prospective cross-sectional study. *Medicine (Baltimore)*,**95**,e3019.
- 60- Santos BR, Lecke SB, Spritzer PM (2017). Genetic variant in vitamin D-binding protein is associated with metabolic syndrome and lower 25-hydroxyvitamin D levels in polycystic ovary syndrome: A cross-sectional study. *PLoS One*,**12**,e0173695.
- 61- Azevedo LA, Matte U, Silveira TR, et al (2017). Effect of Vitamin D Serum Levels and GC Gene Polymorphisms in Liver Fibrosis Due to Chronic Hepatitis C. *Ann Hepatol*,**16**,742-8.
- 62- Tagliabue E, Raimondi S, Gandini S (2015). Meta-analysis of vitamin D-binding protein and cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*,**24**,1758-65.
- 63- Peng Q, Yang S, Lao X, et al (2014). Association of single nucleotide polymorphisms in VDR and DBP genes with HBV-related hepatocellular carcinoma risk in a Chinese population. *PLoS One*,**9**,e116026.
- 64- Grzegorzewska AE, Świdarska MK, Mostowska A, Warchoń W, Jagodziński PP (2016). Polymorphisms of Vitamin D Signaling Pathway Genes and Calcium-Sensing Receptor Gene in respect to Survival of Hemodialysis Patients: A Prospective Observational Study. *Int J Endocrinol*,**2016**,2383216.
- 65- Akiba T, Morikawa T, Odaka M, et al (2018). Vitamin D Supplementation and Survival of Patients with Non-small Cell Lung Cancer: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clin Cancer Res*,**24**,4089-97.
- 66- Ying HQ, Sun HL, He BS, et al (2015). Circulating vitamin D binding protein, total, free and bioavailable 25-hydroxyvitamin D and risk of colorectal cancer. *Scientific Reports*,**5**,7956.
- 67- Vidigal VM, Silva TD, de Oliveira J, et al (2017). Genetic polymorphisms of vitamin D receptor (VDR), CYP27B1 and CYP24A1 genes and the risk of colorectal cancer. *Int J Biol Markers*,**32**,e224-e230.
- 68- Praetorius Bjork M, Johansson B (2018). Gamma-Glutamyltransferase (GGT) as a biomarker of cognitive decline at the end of life: contrasting age and time to death trajectories. *Int Psychogeriatr*,**30**,981-90.
- 69- Giannini EG, Trevisani F (2014). Accuracy of alpha-fetoprotein measurement in detection of hepatocellular carcinoma--1 more nail in the coffin. *Clin Gastroenterol Hepatol*,**12**,2138-9.
- 70- Yang JG, He XF, Huang B, et al (2018). Rule of changes in serum GGT levels and GGT/ALT and AST/ALT ratios in primary hepatic carcinoma patients with different AFP levels. *Cancer Biomark*,**21**, 743-6.

- 71- Giannini EG, Savarino V (2013). Predicting the posttransplant prognosis of patients with hepatocellular carcinoma: what lies beneath alpha-fetoprotein? *Liver Transpl*,**19**,1166-7.
- 72- Calmarza P, Sanz Paris A, Prieto Lopez C, Llorente Barrio M, Boj Carceller D (2018). [Vitamin D levels in patients with recent cancer diagnosis]. *Nutr Hosp*,**35**,903-8.
- 73- Finkelmeier F, Kronenberger B, Koberle V, et al (2014). Severe 25-hydroxyvitamin D deficiency identifies a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma - a prospective cohort study. *Aliment Pharmacol Ther*,**39**,1204-12.
- 74- Garcia-Martin E, Agundez JA, Maestro ML, et al (2013). Influence of vitamin D-related gene polymorphisms (CYP27B and VDR) on the response to interferon/ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *PLoS One*,**8**, e74764.
- 75- Pontoriero AC, Trinks J, Hulaniuk ML, et al (2015). Influence of ethnicity on the distribution of genetic polymorphisms associated with risk of chronic liver disease in South American populations. *BMC Genet*,**16**, 93.
- 76- Zhao XY, Li J, Wang JH, et al (2016). Vitamin D serum level is associated with Child-Pugh score and metabolic enzyme imbalances, but not viral load in chronic hepatitis B patients. *Medicine (Baltimore)*,**95**, e3926.
- 77- Piotrowska A, Wierzbicka J, Nadkarni S, et al (2016). Antiproliferative Activity of Double Point Modified Analogs of 1,25-Dihydroxyvitamin D(2) Against Human Malignant Melanoma Cell Lines. *Int J Mol Sci*,**17**.
- 78- Pereira-Santos M, Santos J, Carvalho GQ, et al (2018). Epidemiology of vitamin D insufficiency and deficiency in a population in a sunny country: Geospatial meta-analysis in Brazil. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1-8.
- 79- Beiguelman B 1996. Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações., Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética.
- 80- Pena SDJ (2005). Dossiê raça, genética, identidades e saúde: Razões para banir o conceito de raça da medicina brasileira. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*, Rio de Janeiro,**12**,321-46.
- 81- Sonderman JS, Munro HM, Blot WJ, et al (2012). Reproducibility of serum 25-hydroxyvitamin d and vitamin D-binding protein levels over time in a prospective cohort study of black and white adults. *Am J Epidemiol*,**176**, 615-21.
- 82- Hung CH, Chiu YC, Hu TH, et al (2014). Significance of vitamin d receptor gene polymorphisms for risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Transl Oncol*,**7**, 503-7.
- 83- Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, et al (2016). Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev*,**96**, 365-408.
- 84- Castro LC (2011). The vitamin D endocrine system. *Arq Bras Endocrinol Metabol*,**55**,566-75.
- 85- John GB, Cheng CY, Kuro-o M (2011). Role of Klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD. *Am J Kidney Dis*,**58**,127-34.
- 86- Almquist M, Bondeson AG, Bondeson L, Malm J, Manjer J (2010). Serum levels of vitamin D, PTH and calcium and breast cancer risk-a prospective nested case-control study. *Int J Cancer*,**127**,2159-68.
- 87- Martins JS, Palhares MO, Teixeira OCM, Ramos MG (2017). Vitamin D Status and Its Association with Parathyroid Hormone Concentration in Brazilians. *J Nutrition Metabol*,**28**,1-5.

Agradecimentos

Os autores agradecem a todos os colaboradores do Laboratório Núcleo de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular-NPBIM, ao Professor Moacir Fernandes de Godoy pela ajuda estatística, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-FAMERP, pelo suporte técnico-científico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro na execução deste trabalho (Processo: 2015/04338-1).

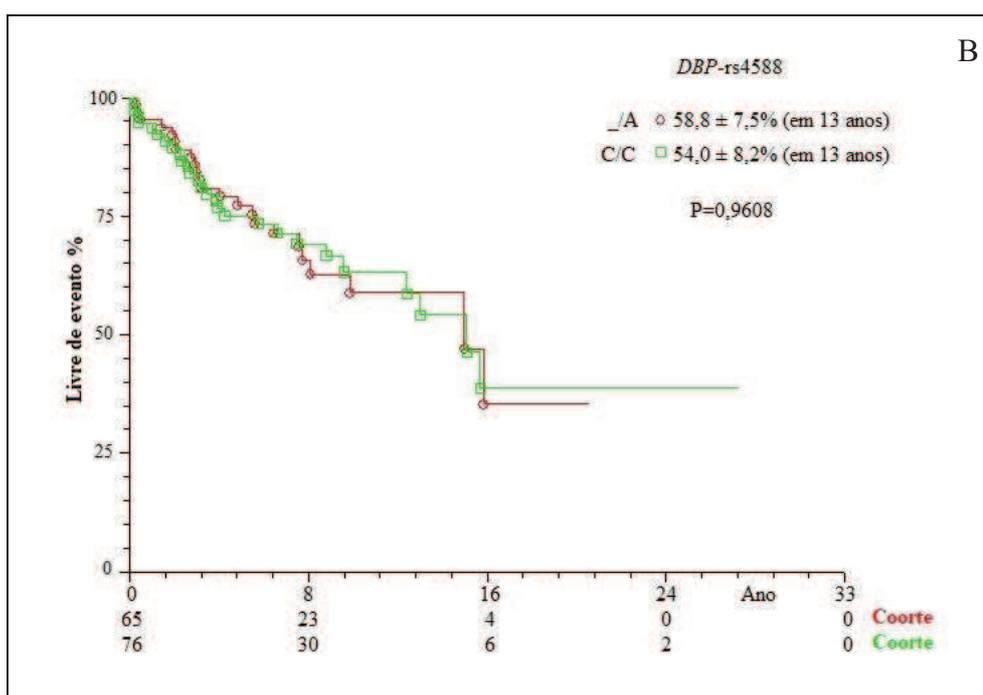
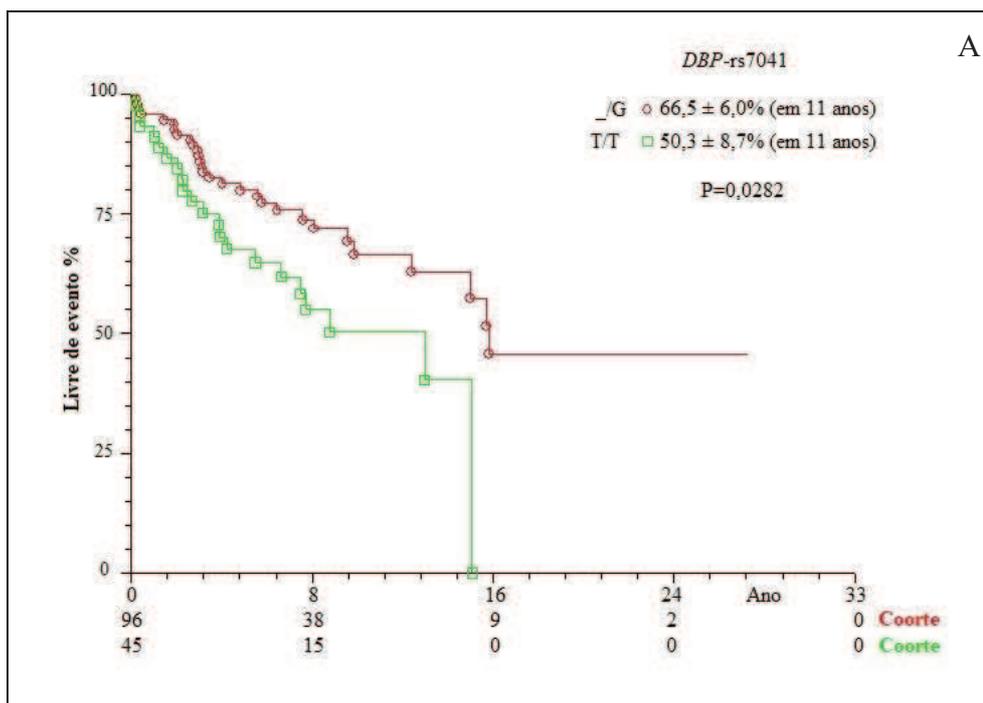


Figura 1. Curva atuarial de Kaplan-Meier para livres de evento (morte), considerando os polimorfismos (A) *DBP-rs7041* e (B) *DBP-rs4588* em pacientes com cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular, portadores de genótipos com pelo menos um alelo polimórfico (_/G e _/A, respectivamente), comparado ao genótipo homocigoto selvagem (T/T, para ambos). DBP=*Vitamin D-binding protein*.

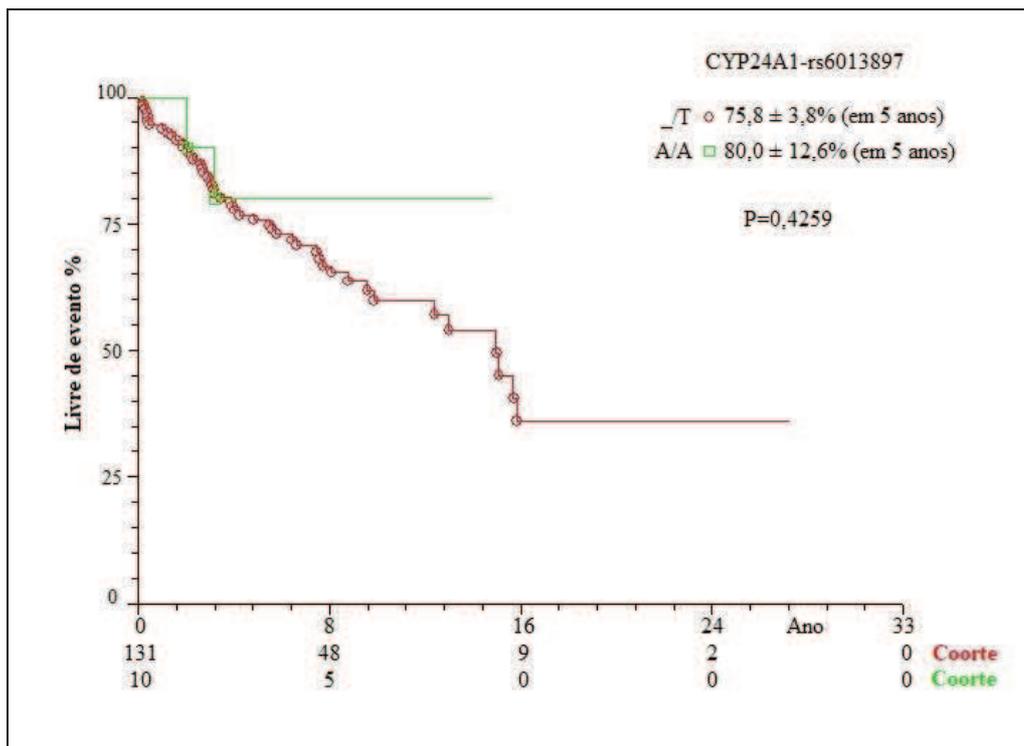


Figura 2 Curva atuarial de Kaplan-Meier para livre de evento (morte), considerando o polimorfismo *CYP24A1*-rs6013897 em pacientes com cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular, portadores de genótipos com pelo menos um alelo polimórfico ($_T$), comparado ao genótipo homocigoto selvagem (A/A). *CYP24A1*= *Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1*.

Tabela 1. Perfil demográfico, hábitos de vida e comorbidades no grupo total de pacientes (GTotal), pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular (G1), com cirrose isolada (G2), e indivíduos sem a doença (G3).

Característica	GTotal (N=158)		G1 (N=60)		G2 (N=98)		G3 (N=225)		*Valor-P			
	N	%	N	%	N	%	N	%	GTotal x G3	G1 x G2	G1 x G3	G2 x G3
Sexo	N	%	N	%	N	%	N	%				
Masculino	124	78,5	50	83,3	74	75,5	127	56,4	<0,0001	0,0002	0,0018	0,3361
Feminino	34	21,5	10	16,7	24	24,5	98	43,6				
Hábito de vida	N	%	N	%	N	%	N	%				
Tabagismo	74	46,8	27	45,0	47	48,0	45	20,0	<0,0001	0,8434	<0,0001	<0,0001
Etilismo	98	62,0	39	65,0	59	60,2	26	11,6	<0,0001	0,6643	<0,0001	<0,0001
Comorbidade	N	%	N	%	N	%	N	%				
DM	41	26,0	16	26,7	25	25,5	8	3,6	<0,0001	0,8721	<0,0001	<0,0001
HAS	53	33,5	18	30,0	35	35,7	70	31,1	0,6959	0,5723	0,9934	0,4947

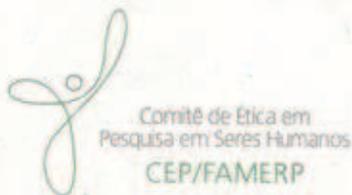
P=Nível de significância; *Teste Qui-quadrado ou Fisher; N=Número de indivíduos; DM=Diabetes mellitus; HAS=Hipertensão arterial sistêmica.

Tabela 2. Perfil de risco por análise de regressão logística em grupo total de pacientes (GTotal = cirrose com ou sem carcinoma hepatocelular – CHC), pacientes com cirrose e CHC (G1), com cirrose isolada (G2) comparado a indivíduos saudáveis e subgrupo com indivíduos com dosagem de vitamina D.

Covariantes	GTotal			G1			G2			G1 x G2		
	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	*Valor-P	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	*Valor-P	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	*Valor-P	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	*Valor-P
Tabagismo	2,05	1,16 – 3,63	0,0129	-	-	-	2,50	1,34 – 4,65	0,004	-	-	-
Etilismo	12,68	7,13 – 22,56	<0,0001	24,36	10,25 – 57,91	<0,0001	10,51	5,65 – 19,57	<0,0001	-	-	-
DM	11,11	4,58 – 26,97	<0,0001	15,27	4,53 – 51,47	<0,0001	10,04	3,85 – 26,17	<0,0001	-	-	-
HAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Idade	1,03	1,01 – 1,05	0,0031	1,08	1,04 – 1,12	<0,0001	-	-	-	1,08	1,03 – 1,13	0,0005
Sexo masculino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,36	1,17 – 9,59	0,0237
<i>DBP</i> -rs4588_/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>DBP</i> -rs7041_/G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>CYP24A1</i> -rs6013897_/T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,18	1,50 – 133,71	0,0205
Hepatites virais	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,09	1,22 – 7,81	0,0169
GGT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,85	1,40 – 10,58	0,009
AFP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,46	2,32 – 12,88	0,0001
Creatinina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,58	1,41 – 9,07	0,0071
Covariantes	GTd			G1d			G2d			G1d x G2d		
	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	*Valor-P	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	*Valor-P	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	*Valor-P	Odds Ratio	Intervalo de Confiança	*Valor-P
Tabagismo	-	-	-	14,50	1,10 – 189,46	0,0414	-	-	-	-	-	-
Etilismo	21,68	2,56 – 183,21	0,0047	12,10	1,09 – 1,10	0,0421	-	-	-	-	-	-

*Nível de significância= $P < 0,05$; DM=Diabetes mellitus; HAS=Hipertensão arterial sistêmica; *DBP*=Vitamin D-binding protein; *CYP24A1*=Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1; GGT= gama glutamil transferase, AFP= Alfa-fetoproteína, d= subgrupo de indivíduos com dosagem de vitamina D.

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto aprova a extensão de projeto intitulada "Expressão gênica e haplótipos de genes envolvidos na sinalização celular e o risco para carcinoma hepatocelular", referente ao protocolo CEP nº 6910/2011 sob a responsabilidade de Rita de Cássia Martins Alves da Silva, com o título "Influência de fatores clínicos, genéticos e bioquímicos no Carcinoma Hepatocelular".

São José do Rio Preto, 14 de fevereiro de 2014.

Luciano Garcia Lourenção
Prof. Dr. Luciano Garcia Lourenção
Vice-Presidente do CEP/FAMERP

ANEXO II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE ESCLARECIMENTO LIVRE E PÓS-ESCLARECIDO

1) Dados de identificação do paciente

Amostra: _____ Prontuário: _____

Nome: _____

Sexo: _____ Data de Nascimento: _____ Telefone: _____

Endereço: _____ Bairro: _____

Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____

2) Dados sobre a pesquisa científica:

Título do projeto: **“Influência de Fatores Clínicos, Genéticos e Bioquímicos no Carcinoma Hepatocelular”**

Pesquisador: Profa. Dra. Rita de Cássia Martins Alves da Silva

Instituição: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa intitulada: **“Influência de Fatores Clínicos, Genéticos e Bioquímicos no Carcinoma Hepatocelular”**

Essa pesquisa inclui pacientes com diagnóstico de câncer e também pacientes sem a doença, e é importante para verificar se existem substâncias alteradas nas suas células relacionadas com problemas no fígado. Sua participação consiste doar uma pequena amostra de sangue e/ou autorizar a utilização da amostra de biópsia já realizada (no caso de paciente em tratamento, feita por médico responsável) para fazer exames bioquímicos e genéticos. O material biológico coletado será armazenado para estudos futuros. Os riscos são mínimos e conhecidos, como discreta dor de picada de agulha e, às vezes, uma mancha arroxeadada no local que desaparece em poucos dias. No caso de anormalidades nos exames você será comunicado e orientado para tratamento, se necessário. Queremos deixar claro que o seu nome nunca será divulgado, nem a origem das informações que você fornecer. Este projeto é coordenado pela Profa. Dra. Rita de Cássia Martins Alves da Silva e durante a pesquisa você poderá tirar qualquer dúvida a respeito do trabalho e se necessário, entrar em contato pelo telefone (17) 3201-5864, na

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. Você não terá nenhuma despesa com a pesquisa. Caso você não aceite ou desista de participar da nossa pesquisa, isto não influenciará em hipótese alguma no seu atendimento e tratamento. Se você tiver alguma dúvida sobre esse acordo ou sobre seus direitos, você poderá ainda entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelo telefone (17) 3201-5813.

Data:...../...../.....

Pesquisador responsável

Assinatura do paciente ou
responsável.

ANEXO III – Extração de DNA

Núcleo de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular – NPBIM Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

EXTRAÇÃO DE DNA DE SANGUE

O DNA genômico (total) é extraído de sangue periférico (1 mL) coletados com o anticoagulante EDTA, segundo o protocolo de Extração Salina ou "salting-out" (Salazar *et. al.*, 1998). O método consiste em três etapas, compreendendo: a) Lise das células sanguíneas e desproteinização; b) Precipitação do DNA; c) Ressuspensão. O procedimento é descrito a seguir:

1ª ETAPA

1. Obter o sangue periférico total colhido em tudo vacutainer contendo EDTA (1mg/mL de sangue), identificando cada amostra.
2. Transferir 2 mL de sangue para 2 tubos de microcentrifuga esteril, sendo 1 mL em cada. Identificar os tubos na tampa e lateral.
3. Centrifugar a 5000 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos, a temperatura ambiente (TA) e desprezar o plasma.
4. Adicionar ao sedimento 900 µL de Tampão 1x com Triton (lise da membrana plasmática e liberação de hemoglobina).
5. Homogeneizar utilizando o Vortex por 1 minuto.
6. Centrifugar a 5000 rpm a TA por 5 minutos.
7. Descartar o sobrenadante por inversão (devagar e constantemente) e adicionar ao sedimento 1 mL de Tampão 1x.
8. Repetir os 3 passos anteriores por 3 vezes, ou até que o sedimento contendo os leucócitos esteja branco (isento de hemoglobina).
9. Descartar o sobrenadante por inversão. Ressuspender o sedimento com 200 µL de Tampão 2 1x e homogeneizar bem a suspensão.
10. Adicionar 20 µL de solução de SDS 10%. Misturar a suspensão utilizando a pipeta, de forma a não fazer espuma.
11. Incubar a amostra a 56 °C em banho-maria por 15 minutos (lise do envoltório nuclear e liberação do DNA).
12. Retirar do banho-maria e adicionar 100 µL de NaCl 5M, homogeneizar bem.
13. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos a TA (precipitação das proteínas).
14. Transferir o sobrenadante (DNA) para um novo tubo de microcentrifuga esteril com identificação da amostra, descartando o precipitado juntamente com o tubo.
15. Adicionar à solução 1 mL de Etanol absoluto gelado e homogeneizar por inversão lenta do tubo por várias vezes. Nota-se a precipitação do DNA.

**Núcleo de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular – NPBIM
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP**

16. Incubar as amostras no congelador ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) *overnight*. Identificá-las.

2ª ETAPA

1. Retirar a amostra do congelador e centrifugá-las a 12000 rpm por 5 minutos a TA.
2. Descartar o sobrenadante (Etanol) cuidadosamente por inversão.
3. Adicionar ao precipitado 1 mL Etanol 70 % gelado e homogeneizar bem.
4. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos a TA.
5. Repetir os três passos anteriores.
6. Remover o Etanol por inversão, cuidando para não descartar o precipitado.
7. Acondicionar o tudo de microcentrífuga em papel absorvente limpo, até que o Etanol evapore (aproximadamente 5 horas).

3ª ETAPA

1. Ressuspender o precipitado em 100 μL de Tampão TE (pH 8,0).
2. Incubar em banho-maria a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, reidratando o DNA.
3. Identificar as amostras escrevendo no suporte: "Correr genômico", data, nome do responsável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Salazar, L. A.; Hirata, M.H.; Cavalli, S. A.; Machado, M. O.; Hirata, R. D. C. **Optimized Procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing.** *Clinical Chemistry* 44, n 8, 1998.

ANEXO IV - Questionário

() **Caso** (Cirrose) () **Controle** Amostra: _____**1. IDENTIFICAÇÃO**

Nome: _____

Prontuário: _____ Data de Nascimento e Idade: _____

Sexo _____ Naturalidade: _____

Endereço _____

Telefone: _____

Bairro _____ Cidade: _____ CEP: _____

2. HISTÓRICO MÉDICO**Fatores de risco:**

I. () Cirrótico II. () Vírus B III. () Vírus C IV. () Esteatohepatite V. () Álcool >20gr/dia VI. () Hemocromatose VII. () Doença de Wilson VIII. () Hepatite auto-imune IX. Outra doença hepática: () Sim, qual? _____

Viveu no campo: _____ por quanto tempo? _____ Teve contato com agrotóxicos: _____

X. Hipertensão: _____ XI. Diabetes: _____ XII. Outras doenças: _____

Medicamentos em Uso: _____

Exame Físico Geral

Peso: _____ kg Altura: _____ m IMC: _____ Qual foi o maior peso? _____ kg

Há quanto tempo? _____ Por quanto tempo? _____

PAS: _____ PAD: _____

3. DADOS DO TUMOR:**I) Diagnóstico:**

1. () Imagem

2. Wash Out? () sim () **Diagnóstico**() não 3. Dosagem de α -fetoproteína() Menor que 200 () **Diagnóstico**() Menor que 200 () **Biópsia****II) Localização e Tipo**

Segmentos: _____ Invasão Vascular? () Sim () Não

Tipo: () nodular: nº. de nódulos: _____ Diâmetro dos nódulos: _____

() infiltrativo

III) Tratamento recebido:

() Transplante () Ressecção () Quimioembolização (TACE) () Alcoolização

() Sorafenib () RF (Radio Freqüência) () Medidas de suporte () Metástase?

Onde: _____

4. HISTÓRIA FAMILIAR

Apresenta familiares em 1º grau (pais, irmãos) com CHC: _____

Outros tipos de cânceres: _____

Pesquisador responsável pela entrevista: _____