



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Instituto de Medicina Preventiva e Saúde Pública

O Papel dos Heparano-Sulfatos nas Infeções Víricas

Sara Fernandes Vieira Lopes

Orientado por:

Prof. Doutora Maria Clara Bicho

Coorientado por:

Prof. Doutor Manuel Bicho

Julho'2023

Resumo

Os Proteoglicanos de Sulfato de Heparano (HSPG) encontram-se presentes tanto na membrana celular como na matriz extracelular (MEC), sendo libertados e mobilizados pela ação das metaloproteinases (MMPs) e da Heparanase (HPSE). Estes proteoglicanos caracterizam-se pela sua carga negativa (conferida pelo grupo Sulfato de Heparano – HS) que lhes permite o sequestro de água e catiões (sódio e cálcio) e também pela capacidade de se ligarem a uma grande variedade de moléculas (tais como, proteínas da matriz extracelular, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, tendo também sido demonstrado que funcionam como corretores celulares para um grande número de vírus) e assim regular diversas funções biológicas. Este trabalho tem como objetivo rever evidências do papel dos sulfatos de heparano nos mecanismos patogénicos das infeções víricas, com especial enfoque no vírus da hepatite C. Como exemplo baseámo-nos num estudo realizado no Laboratório de Genética da FMUL para tentar entender a influência de um polimorfismo funcional (rs4693608) do gene da HPSE na progressão para os estadios de fibrose, numa amostra populacional com hepatite C crónica (HCC). Identificou-se que a idade e as atividades séricas dos enzimas ALP, AST, ALT e GGT se encontravam mais elevadas e o número de plaquetas diminuído, nos estadios de fibrose mais elevados (F3/4). Na associação genótipo e fenótipo intermédio, houve uma relação deste polimorfismo com níveis mais elevados de IMC, GGT e RNA. Concluindo-se, assim, através dos resultados obtidos das associações entre o fenótipo intermédio e o fenótipo distante, e também do genótipo com o fenótipo intermédio, que este polimorfismo afeta a progressão da fibrose.

Palavras-chave: sulfatos de heparano; heparanase; infeções víricas; vírus da hepatite C; hepatite C crónica.

Abstract

Heparan sulfate proteoglycans (HSPG) are present both in the cell membrane and in the extracellular matrix (ECM), being released and mobilized by the action of metalloproteinases (MMPs) and heparanase (HPSE). These proteoglycans are characterized by their extreme negative charge (conferred by the heparan sulfates - HS) which allows them to sequester water and cations (sodium and calcium), and also by their ability to bind to a wide variety of molecules (such as, extracellular matrix proteins, growth factors, cytokines and chemokines, and also serve as cellular correctors for a wide variety of viruses) and thus regulate diverse biological functions. This work aims to review evidence of the role of heparan sulfates in the pathogenic mechanisms of viral infections, with a special focus on the hepatitis C virus (HCV). We used a study conducted at the Laboratory of Genetics of FMUL as an example, which aims to understand the influence of the HPSE gene functional polymorphism (rs4693608) in the progression to fibrosis stages in chronic hepatitis C individuals. In the higher stages of fibrosis (F3/4), we observed that the age and the serum activities of hepatic enzymes (ALP, AST, ALT and GGT) were higher, and the number of platelets was lower. There was also an association between genotype and intermediate phenotype with the aforementioned polymorphism and higher levels of BMI, GGT and viral load (viral RNA). Our results provide evidence for an association between intermediate and distant phenotypes, and also between genotype and intermediate phenotype, leading us to conclude that the polymorphism investigated here affects the progression of fibrosis.

Keywords: heparan sulfates; heparanase; viral infections; hepatitis C virus; chronic hepatitis C.

O Trabalho Final é da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à FMUL pelos conteúdos nele apresentados.

ÍNDICE

○ RESUMO	1
○ ÍNDICE	2
○ ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
○ ÍNDICE DE TABELAS.....	5
○ SIGLAS E ACRÓNIMOS	7
○ INTRODUÇÃO	10
○ SULFATOS DE HEPARANO.....	12
▪ SINDECANOS	14
▪ GLIPICANOS	15
○ HS E AS INFEÇÕES VÍRICAS	16
▪ FASES DE INFEÇÃO	16
○ GENE DA HEPARANASE (HPSE)	18
○ HEPARANASE	19
○ HEPARANASE E A INFEÇÃO VIRAL	20
○ VÍRUS DA HEPATITE C	21
▪ GENÓTIPOS E AS SUAS VARIANTES.....	23
▪ CICLO DE VIDA DO HCV	24
▪ TRANSMISSÃO	25
○ HEPATITE C AGUDA E CRÓNICA	26
▪ FATORES DE RISCO PARA A EVOLUÇÃO DA CRONICIDADE	27
▪ <i>FATORES DO HOSPEDEIRO</i>	27
▪ <i>FATORES VIRAIS</i>	30
▪ <i>FATORES AMBIENTAIS</i>	30
○ MARCADORES DE DOENÇA HEPÁTICA	31

○ VARIANTES GENÉTICAS POLIMÓRFICAS	33
○ POLIMORFISMOS DA HPSE	34
○ OBJETIVOS DO TRABALHO	37
○ MATERIAIS E MÉTODOS	38
▪ CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA POPULACIONAL.....	38
▪ CRITÉRIOS DE INCLUSÃO/EXCLUSÃO.....	38
▪ PARÂMETROS RECOLHIDOS.....	39
▪ AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA FIBROSE	40
▪ ESTUDOS GENÉTICOS.....	40
▪ ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
○ RESULTADOS.....	42
▪ ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO HPSE A/G COM A SUSCETIBILIDADE PARA O DESENVOLVIMENTO DE HCC.....	43
▪ ASSOCIAÇÃO DOS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS COM O ESTADIO DE FIBROSE.....	44
▪ ASSOCIAÇÃO POLIMORFISMO GENÉTICO DA HPSE COM O ESTADIO DE FIBROSE.....	46
▪ ASSOCIAÇÃO DOS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS COM O POLIMORFISMO HPSE A/G.....	47
▪ ASSOCIAÇÃO DOS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS COM O ESTADIO DE FIBROSE PARA OS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO HPSE A/G.....	51
▪ CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS.....	55
▪ CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS POR GENÓTIPO	56
▪ RESUMO DOS RESULTADOS.....	59
○ DISCUSSÃO	60
○ CONCLUSÃO.....	67
○ PERSPETIVAS FUTURAS	68
○ AGRADECIMENTOS	69
○ REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

Índice de Figuras

FIGURA 1. ESTRUTURA DO SULFATO DE HEPARANO (HS)	10
FIGURA 2. ESQUEMA DA BIOSÍNTESE DA CADEIA HS.....	12
FIGURA 3. ESTRUTURA DOS SINDECANOS E GLIPICANOS	13
FIGURA 4. LOCALIZAÇÃO GENÉTICA DA HPSE.....	18
FIGURA 5. MODELO DO PAPEL DA HPSE NA LIBERTAÇÃO E EXOCITOSE VIRAL DAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS	20
FIGURA 6. ESTRUTURA DA PARTÍCULA DO VÍRUS DA HEPATITE C	22
FIGURA 7. ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO HCV	22
FIGURA 8. CICLO DE REPLICAÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE C.....	25
FIGURA 9. EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV).....	26
FIGURA 10. MAPA DE SNPs DO GENE DA HPSE.....	34
FIGURA 11. MODELO DA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE DA HPSE	36
FIGURA 12. ASSOCIAÇÃO DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS, SOCIODEMOGRÁFICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS, BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS COM O POLIMORFISMO DA HPSE RS4693608. (GENÓTIPO COM FENÓTIPO INTERMÉDIO).....	59
FIGURA 13. ASSOCIAÇÃO DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS, SOCIODEMOGRÁFICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS, BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS COM O ESTADIO DE FIBROSE. (FENÓTIPO DISTANTE E FENÓTIPO INTERMÉDIO)	59

Índice de Tabelas

TABELA 1. CARATERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS, VIRAIS E HEPÁTICAS (VARIÁVEIS CATEGÓRICAS).	42
TABELA 2. CARATERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS, ANTROPOMÉTRICAS, VIRAIS, CELULARES E BIOQUÍMICAS (VARIÁVEIS CONTÍNUAS).....	42
TABELA 3. ASSOCIAÇÃO DAS POPULAÇÕES (CONTROLO, EUROPEIA E ESTUDADA) COM OS ALELOS DO POLIMORFISMO HPSE A/G	43
TABELA 4. ASSOCIAÇÃO DAS POPULAÇÕES (CONTROLO E ESTUDADA) COM OS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO HPSE A/G.....	43
TABELA 5. ASSOCIAÇÃO DOS ESTÁDIOS DE FIBROSE COM OS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS (VARIÁVEIS CONTÍNUAS).....	44
TABELA 6. ASSOCIAÇÃO DOS ESTÁDIOS DE FIBROSE COM OS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS (VARIÁVEIS CATEGÓRICAS).....	45
TABELA 7. ASSOCIAÇÃO DO ESTÁDIO DE FIBROSE COM OS PARÂMETROS GENÉTICOS	46
TABELA 8. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO HPSE A/G COM OS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS (VARIÁVEIS CATEGÓRICAS)	47
TABELA 9. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO HPSE A/G COM OS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS (VARIÁVEIS CATEGÓRICAS).....	48
TABELA 10. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO HPSE A/G COM OS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS (VARIÁVEIS CONTÍNUAS).....	49
TABELA 11. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO HPSE A/G COM OS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS (VARIÁVEIS CONTÍNUAS).....	50
TABELA 12. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO HPSE A/G COM OS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS (VARIÁVEIS CONTÍNUAS).....	50
TABELA 13. ASSOCIAÇÃO DO ESTÁDIO DE FIBROSE COM OS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS (VARIÁVEIS CATEGÓRICAS) NO GENÓTIPO GG DO POLIMORFISMO HPSE A/G.....	51
TABELA 14. ASSOCIAÇÃO DO ESTÁDIO DE FIBROSE COM OS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS (VARIÁVEIS CATEGÓRICAS) NO GENÓTIPO AG DO POLIMORFISMO HPSE A/G.....	52

TABELA 15. ASSOCIAÇÃO DO ESTADIO DE FIBROSE COM OS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS (VARIÁVEIS CATEGÓRICAS) NO GENÓTIPO AA DO POLIMORFISMO HPSE A/G.	53
TABELA 16. ASSOCIAÇÃO DO ESTADIO DE FIBROSE COM OS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS, SOCIODEMOGRÁFICOS, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS (VARIÁVEIS CONTÍNUAS) COM O ESTADIO DE FIBROSE PARA CADA UM DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO HPSE A/G E ASSOCIAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS DENTRO DO MESMO GRUPO DE ESTADIO DE FIBROSE PARA CADA PARÂMETRO.	54
TABELA 17. CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE OS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS (VARIÁVEIS CONTÍNUAS).	55
TABELA 18. CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE OS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS (VARIÁVEIS CONTÍNUAS) NO GENÓTIPO GG DO POLIMORFISMO HPSE A/G.	56
TABELA 19. CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE OS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS (VARIÁVEIS CONTÍNUAS) NO GENÓTIPO AG DO POLIMORFISMO HPSE A/G.	57
TABELA 20. CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE OS PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS, ANTROPOMÉTRICOS, VIRAIS, CELULARES, METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS (VARIÁVEIS CONTÍNUAS) NO GENÓTIPO AA DO POLIMORFISMO HPSE A/G.	58

Siglas e Acrónimos

AGRP – *agouti-related peptide*

CHC – carcinoma hepatocelular

CHLN – Centro Hospitalar Lisboa Norte

cm – centímetro

DENV – Vírus da Dengue

dl – decilitro

DNA – ácido desoxirribonucleico

g – grama

GLcA – Ácido D-glucurónico

GLcN – D-glucosamina

GPC – glipicanos

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

HCC – Hepatite C crónica

HCV – Vírus da Hepatite C

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPSE – Heparanase

HPV – Vírus do Papiloma Humano

HS – Sulfato de Heparano

HSM – Hospital Santa Maria

HSPG – Proteoglicano de Sulfato de Heparano

HSV – Vírus do Herpes Simplex

HTLF - *helicase-like transcription factor*

IC – intervalo de confiança

IdoA – Ácido L-idurónico

IMC – Índice de massa corporal

Kb – quilobases

kDa – quilodalton

kg – quilograma

kPa – quilopascal

L – litro

m – metro

MC4R – recetor da melanocortina 4

MEC – Matriz extracelular

mg – miligrama

MHz – Megahertz

min – minuto

ml – mililitro

MMP – Metaloproteinase de matriz

ng – nanograma

nm – nanómetro

NR – Não resposta

NS2 – *Non-structural Protein 2*

NS3 – *Non-structural Protein 3*

NS4A – *Non-structural Protein 4 A*

NS4B – *Non-structural Protein 4 B*

NS5A – *Non-structural Protein 5 A*

NS5B – *Non-structural Protein 5 B*

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR – *odds ratio*

ORF – *Open Reading Frame*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

pg- picograma

RE – Retículo endoplasmático

RNA – ácido ribonucleico

RNAm – ácido ribonucleico mensageiro

s – segundo

SDC – sindecanos

SNP – polimorfismo de nucleótido único

U – unidades

µg – micrograma

µl – microlitro

UI – unidade internacional

VR – valor de referência

Introdução

As cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) podem ser classificadas em 4 categorias diferentes dependendo da natureza das unidades dissacarídicas repetidas (Koehler *et al.*, 2020). O sulfato de heparano é um GAG e é um dos principais constituintes de todos os tecidos de mamíferos, são cadeias polissacarídeas lineares, não ramificadas, formadas por unidades alternadas (dissacarídicas) de ácido urónico e glicosamina, sulfatadas. Existem, não tanto como entidades livres mas como cadeias laterais ligadas covalentemente a proteínas “core” específicas presentes na superfície celular - formando os proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPG).

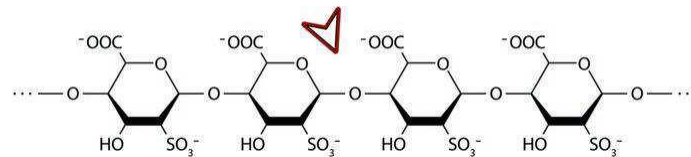


Figura 1. Estrutura do Sulfato de Heparano (HS). Seta – local de clivagem pela HPSE. (Angelidis & Shukla, 2020)

Como resultado da sua alta sulfatação, o HS tem uma densidade de cargas negativas extrema e, assim, liga-se a uma grande variedade de moléculas extracelulares, incluindo fatores de crescimento, citocinas e enzimas. A quebra dessas ligações liberta os fatores sequestrados para o meio e, por isso, ao envolver os seus respetivos recetores, provoca efeitos a jusante. Várias enzimas estão envolvidas na degradação dos HSPGs, em particular a heparanase-1 (Figura 1) (Angelidis & Shukla, 2020; Esko & Lindahl, 2001; Sampaio *et al.* 2021). Apesar da natureza generalizada do HS, pouco se sabe sobre como as suas modificações e clivagem regulam processos celulares importantes e vias de transdução de sinal (Angelidis & Shukla, 2020).

Também pela sua alta sulfatação, os HS servem como um importante recetor, para um grande número de vírus humanos, como o vírus da dengue (DENV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus do papiloma humano (HPV), coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-Cov-2) e para essencialmente todos os herpesvírus (HSV) (Angelidis & Shukla, 2020; Sampaio *et al.* 2021).

Isto ocorre tipicamente através de interações eletrostáticas entre as cargas negativas dos HSPGs e as porções básicas de aminoácidos de proteínas da superfície viral (Sampaio *et al.* 2021). Num estudo de referência, verificou-se que uma rara modificação do HS,

descrita como 3-O-sulfatação, pode interagir com uma proteína essencial do envelope do vírus herpes simplex (HSV) para desencadear a entrada viral nas células. Isso expandiu o papel previamente estabelecido do HS de uma molécula de fixação viral para um recetor essencial necessário para a entrada do vírus na célula ([Angelidis & Shukla, 2020](#)).

A ligação viral à superfície celular e a entrada são as primeiras fases no processo de infeção viral e, como tal, têm sido objeto de numerosos estudos com o objetivo de bloquear essa interação inicial. Como existem múltiplas formas de reduzir o contacto viral com o HS da superfície celular (HPSE, heparinase, heparina, HS solúvel e MMPs), investigar esta ligação pode ajudar no conhecimento sobre a entrada na célula e possíveis terapêuticas ([Angelidis & Shukla, 2020](#); [Sampaio et al. 2021](#)).

Sulfatos de Heparano

Um complexo processo de biossíntese é responsável pela produção e modificação dos HS, através de ações coordenadas de várias glicosiltransferases e sulfotransferases. Estes polissacarídeos representam um tipo de glicosaminoglicanos (GAG), sendo compostos pela repetição de unidades dissacarídicas de D-glucosamina (GlcN) e ácido urónico (ácido D-glucurónico (GlcA) ou ácido L-idurónico (IdoA)), com adições variáveis de grupos sulfato e outras modificações (Figura 2) (Angelidis & Shukla, 2020; Esko & Lindahl, 2001).

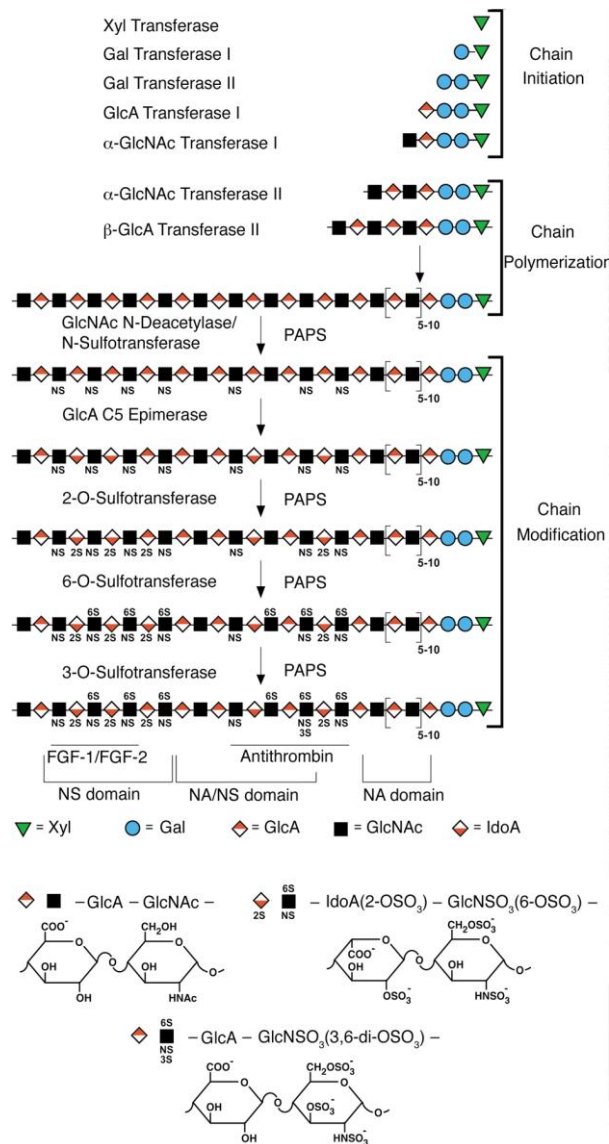


Figura 2. Esquema da biossíntese da cadeia HS. Os domínios estruturais (NA, NA/NS, NS) são definidos em relação à distribuição de N-substituintes de GLcN, conforme indicado. (N-acetilado e N-sulfatado). Também são mostradas regiões que foram implicadas na ligação de ligantes específicos, como FGF-1/FGF-2 e antitrombina. (Esko & Lindahl, 2001)

Como já referido, os HS ligam-se covalentemente a proteínas “core” específicas constituindo assim a superfamília dos HSPGs. Podemos distinguir duas subfamílias principais de HSPGs membranares os sindecanos e os glipicanos (Figura 3). Existindo também já descritos vários HSPGs menores como o epicano, betaglicano e outros ([Esko & Lindahl, 2001](#); [Sampaio et al. 2021](#)).

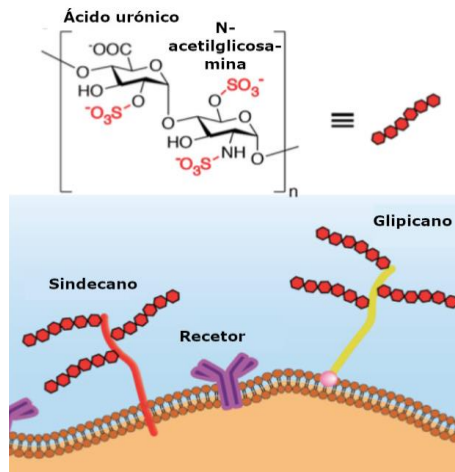


Figura 3. Estrutura dos sindecanos e glipicanos. Os HSPG contêm tipicamente uma proteína central e cadeias laterais de GAG. A proteína central dos SDC é composta por três domínios (extracelular, transmembranar e citoplasmático), a dos GPC está ancorada na membrana. ([Sampaio et al. 2021](#))

Os vários tecidos do corpo humano contêm diferentes isoformas de HSPGs e o seu papel biológico vai estar então dependente das propriedades do seu núcleo proteico, composições de GAGs, e modificações biossintéticas que estas cadeias recebem in-situ, padrões de sulfatação e localização nas células e tecidos ([Esko & Lindahl, 2001](#); [Sampaio et al. 2021](#)).

Como componentes da MEC, os HSPGs contribuem para a organização da membrana basal e medeiam a aderência e motilidade celular. Como parte das vesículas secretoras (em particular a serglicina), asseguram o correto funcionamento do seu conteúdo (ou seja, de proteases ou de proteínas matriciais). Na superfície celular ligam-se a citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, impedindo a sua degradação, criando assim locais de armazenamento temporário ou gradientes de morfogéneos importantes no desenvolvimento. Servem como recetores de endocitose regulando a degradação lisossômica de recetores celulares e de moléculas extracelulares, fornecedoras de nutrientes às células (o caso das lipoproteínas). São mediadores do transporte transcelular de quimiocinas através das células endoteliais, servem como corretores do fator de crescimento do fibroblasto (FGF) e respetivo recetor, medeiam a sinalização

ou stress intracelular através do desprendimento proteolítico de sindecanos e têm um papel importante no desenvolvimento e na manutenção de nichos de células estaminais ([Sampaio et al. 2021](#)).

Sindecanos

Os quatro sindecanos (sindecano-1, -2, -3 e -4) representam os HSPGs membranares mais abundantes, têm uma proteína “core” composta por três domínios estruturais característicos: extracelular (ectodomínio), transmembranar e citoplasmático ([Esko & Lindahl, 2001](#); [Sampaio et al. 2021](#)).

O ectodomínio, exposto à matriz extracelular (MEC), contém 3 a 5 cadeias exclusivas de HS embora, em alguns tecidos, sejam expressas formas híbridas contendo HS e outro GAG ([Esko & Lindahl, 2001](#)). Este domínio é variável e intrinsecamente desorganizado, o que lhe permite interagir com uma imensa variedade de moléculas e daí exercer as mais variadas funções biológicas. Na região proximal existe um local de clivagem pelas metaloproteinases (MMPs), e da proteólise resulta a descamação (com libertação e mobilização) dos ectodomínios da superfície celular ([Esko & Lindahl, 2001](#); [Sampaio et al. 2021](#)).

Um curto segmento hidrofóbico transmembranar fixa o PG à membrana plasmática. Os SDCs podem ainda ser internalizados por endocitose e degradados em lisossomas, sugerindo que os domínios transmembranar e/ou citoplasmático contêm sequências que podem interagir com proteínas envolvidas na endocitose ([Esko & Lindahl, 2001](#)). Assim, alguns SDCs são responsáveis pela endocitose, mediada por recetores, de ligandos como lipoproteínas de baixa densidade, transferrina, fatores de crescimento, vírus, etc ([Koehler et al., 2020](#)).

O domínio citoplasmático apresenta, também, sequências de peptídeos que se ligam a proteínas do citoesqueleto e que servem como substratos para cinases celulares ([Esko & Lindahl, 2001](#)). Assim, os SDCs podem atuar como moléculas de sinalização ([Esko & Lindahl, 2001](#); [Koehler et al., 2020](#)).

Sabe-se que os sindecano-3 têm um papel importante na regulação do balanço energético, apesar do seu mecanismo não se encontrar ainda completamente

esclarecido, Reizes et al. sugeriram três hipóteses para a influência do sindecano-3 na ingesta alimentar e balanço energético, sendo elas: [\(Reizes et al., 2006\)](#)

- facilitar a ação direta da AGRP no MC4R;
- a ação indireta dos sindecanos clivados;
- interferir com o mecanismo que regula o gasto de energia, independentemente da ingesta alimentar.

É possível que a função do sindecano-3 no hipotálamo seja semelhante à sua função nas outras regiões cerebrais, destacando-se o seu papel no hipocampo, na promoção da plasticidade e desenvolvimento de sinapses. Este estudo apresentou, assim, uma hipótese para a função dos sindecano-3, e possível relação com os HSPG, no SNC, na regulação sináptica da homeostasia energética. [\(Reizes et al., 2006\)](#)

Glipicanos

Os seis glipicanos são distinguidos pelos seus ectodomínios globulares ricos em cisteína, e a presença de 2 a 3 cadeias de HS ligadas apenas entre o domínio globular e a porção glicosilfosfatidilinositol (GPI) que o ancora ao folheto externo da membrana celular [\(Esko & Lindahl, 2001; Sampaio et al., 2021\)](#). Comparativamente aos sindecanos, a localização das cadeias de GAGs nos glipicanos (perto do domínio justamembranar), aproxima as partículas virais do seu recetor conhecido [\(Koehler et al., 2020\)](#).

A libertação de glipicanos por mecanismos do tipo fosfolipase C ainda não foi documentada mas, tal como os SDCs, estes HSPGs podem ser degradados por endocitose e degradação lisossómica [\(Esko & Lindahl, 2001\)](#).

A localização estratégica dos HSPGs nos tecidos é fundamental para o seu papel funcional. A localização de SDCs e GPCs na membrana citoplasmática regula a sinalização intracelular e célula-MEC. A localização dos HSPGs na membrana basal regula as suas funções de barreira e coordena as interações célula-célula e célula-MEC [\(Sampaio et al. 2021\)](#).

HS e as Infecções Víricas

Para se replicarem e evitarem o reconhecimento pelo sistema imunitário na MEC que, para além disso, poderá apresentar condições hostis para certos vírus, as partículas virais devem iniciar a entrada nas células de forma relativamente rápida ([Koehler et al., 2020](#); [Zhu et al., 2011](#)).

Os HSPGs, devido a cadeias GAG altamente sulfatadas apresentam uma carga global negativa que lhes permite interagir, electrostaticamente, com os resíduos básicos das glicoproteínas da superfície viral ou das proteínas capsuladas virais de vírus não envelopados. Estas interações são geralmente de baixa afinidade, no entanto, como a superfície das partículas virais é coberta com várias centenas de cópias destas proteínas, permite que os vírus formem múltiplas interações em simultâneo com a superfície celular – ligações multivalentes – permitindo compensar a fraca afinidade inerente destas interações e fortalecer a ligação das partículas virais à superfície celular ([Zhu et al., 2011](#)). O uso de oligossacarídeos da superfície celular, como fatores iniciais de ligação, aumenta a infecciosidade viral principalmente por concentrar partículas virais na superfície celular e, desta forma, facilitar a subsequente ligação a recetores virais específicos para a internalização. Em casos raros, os HSPGs servem diretamente como recetores de entrada, tal como descrito para o HSV-1. No entanto, a definição e distinção entre fatores de ligação e recetores de entrada não é tão clara na prática, podendo-se mesmo sobrepor ([Sampaio et al. 2021](#); [Koehler et al., 2020](#); [Zhu et al., 2011](#)).

À medida que o conhecimento sobre a entrada dos vírus nas células aumenta, torna-se evidente que a ligação à superfície celular é mais complexa do que se pensava inicialmente ([Koehler et al., 2020](#)).

Fases de infeção

Grande parte do trabalho inicial sobre o importante papel dos HS no ciclo de vida dos vírus foi obtido do trabalho com o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), um vírus encapsulado, composto por uma cadeia dupla de DNA linear. A entrada do HSV-1 nas células é um processo complexo com múltiplas etapas, envolvendo várias glicoproteínas virais e recetores das células hospedeiras. Na infeção pelo HSV-1, a interação inicial com

o HS é realizada através da ligação das glicoproteínas virais B e C (gB e gC). Esta é maior nas projeções da membrana celular, tais como os filopódios, que expressam maiores quantidades de HS e permitem o transporte de vírus para o corpo da célula num processo dependente da actina denominado “*viral surfing*”. A adição de grupos sulfato, por várias 3-O-sulfotransferases (3-OST), na posição 3-OH do HS confere-lhe a capacidade de se ligar à glicoproteína D (gD), permitindo assim a entrada viral. Expressão mais alta de recetores nectina-1 (recetor de gD), mediador de entrada do HSV na célula, e de HS 3-O-sulfatado no corpo celular permitem a associação mais próxima com os componentes do complexo de fusão viral. Estudos pioneiros usando células de ovário de hamsters chineses resistentes ao HSV-1 concluíram que bastava a sobreexpressão de 3-OST-3b para tornar essas células suscetíveis à entrada viral. Posteriormente, constatou-se que múltiplas 3-OSTs, com expressão e funções específicas de tecido são capazes de produzir essa modificação e tornar as células suscetíveis à infeção ([Angelidis & Shukla, 2020](#)).

Após a entrada na célula, por meio de fusão de membranas ou “*phagocytosis-like uptake*”, uma proteína do tegumento viral, “*virus-host shut-off protein*” (vhs), atua imediatamente para degradar os mRNAs hospedeiros, diminuindo a síntese de proteínas hospedeiras. Enquanto isso, o capsídeo viral é transportado para o núcleo ao longo de microtúbulos, onde liberta o seu material genético para replicação ([Angelidis & Shukla, 2020](#)).

Após a replicação viral e encapsidação do genoma viral, milhares de novos viriões passam por processos de encapsulamento primário e desenvolvimento nas membranas nucleares, seguida de tegumentação e encapsulamento secundário no citoplasma e rede trans-Golgi e, em seguida, são exocitados, havendo disseminação célula-a-célula através da interação com a membrana plasmática. Numa infeção lítica, milhares de viriões são produzidos e, após a encapsidação verifica-se a libertação destes através de várias interações com a membrana celular ou, nos estádios mais recentes da infeção, através da lise celular ([Angelidis & Shukla, 2020](#)). Como as proteínas da membrana viral são sintetizadas usando a maquinaria da célula hospedeira e atravessam a via secretora, são modificadas com glicanos dependentes do hospedeiro. Esta glicosilação além de afetar o reconhecimento imunológico, o enovelamento e conformação proteica, é um

importante modulador da ligação vírus-célula. Dependendo da sua localização, estes glicanos podem, então, influenciar a replicação viral e a patogenicidade (Zhu et al., 2011).

Sabe-se relativamente pouco sobre os passos e requisitos da saída viral das células. Estudos recentes geraram uma maior compreensão desta fase final do ciclo de vida viral com a descoberta da HPSE e HS como principais reguladores da libertação viral (Angelidis & Shukla, 2020).

Gene da Heparanase (HPSE)

O gene da heparanase (HPSE) foi clonado pela primeira vez em 1999 e é constituído por treze exões (Gaskin et al., 2020). Encontra-se localizado no braço longo do cromossoma 4, na região 21.23 (4q21.23) (NationalCenter of Biotechnology Information, 2021).

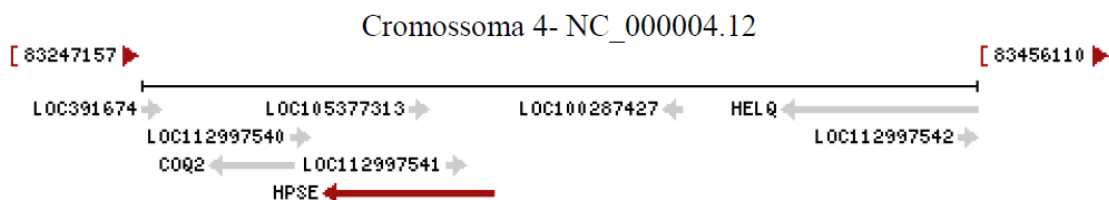


Figura 4. Localização genética da HPSE (Imagem adaptada do site NCBI)

O RNAm da HPSE codifica uma proteína de 61,2 kDa com 543 aminoácidos. Esta enzima é posteriormente clivada em subunidades de 8 e 50 kDa que se vão associar de forma não covalente para originarem a HPSE ativa. A formação de heterodímeros vai ser bastante importante para a atividade da HPSE (Gaskin et al., 2020; Ostrovsky et al., 2007).

Heparanase

A heparanase (HPSE) é uma endoglicosidase e é a única enzima conhecida, em mamíferos, capaz de degradar o HS presente em múltiplos locais celulares, incluindo a matriz extracelular, membrana plasmática e nuclear, libertando as citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias ligadas ao HS ([Angelidis & Shukla, 2020](#); [Vlodavsky et al., 2012](#)). Como tal, para além da sua função enzimática, a HPSE apresenta também funções não enzimáticas como a promoção da adesão celular e a indução da fosforilação do p38, Akt e VEGF, sugerindo que possa ter efeitos numa grande variedade de processos biológicos ([Huang et al., 2012](#)). Esta enzima encontra-se elevada em várias patologias e está envolvida na neovascularização, inflamação e autoimunidade. Têm sido relatadas várias condições externas e sinais celulares que controlam a expressão e atividade da HPSE, como a hipóxia, a inflamação, o stresse oxidante e múltiplos fatores de transcrição ([Angelidis & Shukla, 2020](#)).

Verifica-se a sua expressão em vários tipos de células como os citotrofoblastos, células endoteliais, queratinócitos, mastócitos e células hematopoiéticas, tais como, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfócitos ativados, eosinófilos e plaquetas (destacando-se, estas últimas, por serem as células com o maior reservatório de HPSE) ([Ostrovsky et al., 2007](#); [Fridman et al., 1987](#); [Hulett et al., 1999](#); [Vlodavsky et al., 1992a](#)). Esta é capaz de ativar e polarizar os macrófagos, regular a função granulocítica dos neutrófilos, ativar os linfócitos T e os monócitos ([Caruana et al., 2015](#); [Gutter-Kapon et al., 2016](#); [Kumar et al., 2015](#); [Masola et al., 2018](#)).

Como já referido, esta enzima tem funções e efeitos diferentes consoante o tecido em que se encontra, um exemplo deste fenómeno é encontrado no estudo por Hermano et al. em que referem uma dicotomia na ação da HPSE na síndrome metabólica/diabetes, verificando que consoante a sua localização (locais de produção de insulina vs. locais alvo da mesma) esta vai facilitar ou perturbar a regulação da glicose. Nos ilhéus de Langerhans promove a infiltração pelos macrófagos e a sua subsequente destruição mas, por outro lado, no músculo esquelético é essencial para assegurar a sensibilidade à insulina ([Hermano et al., 2021](#)).

A HPSE é essencial no crescimento tumoral (através da sobreexpressão de VEGF, HGF e

MMP-9) e na invasão tumoral, uma vez que vai degradar um dos principais componentes da MEC, o heparano sulfato (HS), promovendo a adesão endotelial e trombogênese e posterior disseminação (*Fridman et al., 1987; Hulett et al., 1999; Vlodavsky et al., 1992a; Vlodavsky et al., 1992b; Vlodavsky & Friedmann, 2001; Eldor et al., 1987*). As plaquetas têm um papel essencial neste processo e, tendo níveis elevados de HPSE, quando ativadas, libertam a HPSE do seu interior, contribuindo para a destruição a MEC, que é um passo necessário para a invasão tumoral das células endoteliais, têm maior potencial de adesão celular e trombogênese, promovendo assim a metastização (*Cui et al., 2016; Eldor et al., 1987*).

Heparanase e a infeção viral

O papel da HPSE no ciclo de vida viral foi compreendido pela primeira vez, num estudo, por Hadigal et al. através da observação da exocitose do HSV-1, em que se verificou que os níveis de HS na superfície celular diminuem drasticamente com a progressão da infeção, estando praticamente ausentes na fase tardia de infeção, e que este ocorre em concordância com um aumento na expressão de HPSE. Hadigal et al. verificaram que a deleção do gene da HPSE resultava numa diminuição significativa da exocitose viral e a sobreexpressão desta enzima traduzia-se numa libertação e exocitose viral, das células hospedeiras, muito aumentada (*Hadigal et al., 2015; Angelidis & Shukla, 2020*).

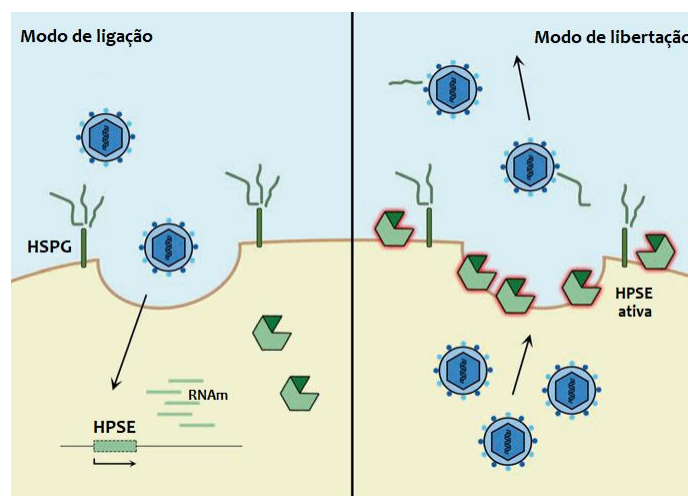


Figura 5. Modelo do papel da HPSE no descolamento e exocitose viral das células hospedeiras. As partículas virais ligam-se aos HSPG para entrar nas células não infetadas. Após a infeção, a HPSE é transcricionalmente sobreexpressa. Na superfície celular, a HPSE cliva resíduos de HS permitindo que as partículas virais sejam libertadas para o ambiente extracelular ou células vizinhas. (*adaptado de Angelidis & Shukla, 2020*)

Hadigal et al. observaram um aumento significativo na expressão da HPSE numa variedade de células de mamíferos e, também, na infeção viral. Esta sobregulação foi observada ao nível da transcrição, tendo sido analisadas as múltiplas formas da HPSE, verificando-se a sobreexpressão significativa das formas ativas e latentes, de HPSE nas células infetadas (com maior predomínio da forma latente). Verificaram que a transcrição da HPSE era similarmente sobregulada por todos os outros herpesvírus testados, incluindo HSV-2, CMV, BoHV e PRV. Concluíram, também, que um fator, no hospedeiro, responsável por este fenómeno é o NF- κ B, que aquando da infeção é translocado para o núcleo e se liga ao promotor da HPSE levando à transcrição da mesma (*Hadigal et al., 2015; Angelidis & Shukla, 2020*). Posteriormente, Hopkins et al., demonstraram, em detalhe, que a infeção por HSV-2 impulsiona a sobregulação transcricional da HPSE, tendo também como principal mecanismo para o aumento da expressão da HPSE, a translocação nuclear do NF- κ B, validando assim o amplo impacto destes achados (*Hopkins et al., 2018; Angelidis & Shukla, 2020*).

Desde a publicação destas descobertas pioneiras, detalhando os novos papéis da HPSE na infeção viral, vários estudos relataram resultados semelhantes noutros sistemas virais, indicando que a sobregulação e a ativação da HPSE pode ser uma estratégia comum a uma ampla gama de espécies virais de forma a aumentar a sua disseminação e transmissão (*Angelidis & Shukla, 2020*).

Vírus da Hepatite C

Este é um vírus encapsulado, de pequenas dimensões, que faz parte do género *Hepacivirus*, e da família *Flaviviridae* (*Bréchet, 1996; Lindenbach et al., 2007*). Tem uma conformação icosaédrica com um envelope lipídico que advém das células hospedeiras infetadas, ao qual se associam duas glicoproteínas virais (E1 e E2). No seu interior encontra-se a nucleocápside, constituída pela cápside e o genoma viral. A cápside é um revestimento proteico, unicamente constituído por proteínas core do HCV, composto por vários capsómeros e que envolve e protege o RNA viral. (*Sharma, S.D., 2010; Amboss, 2023*).

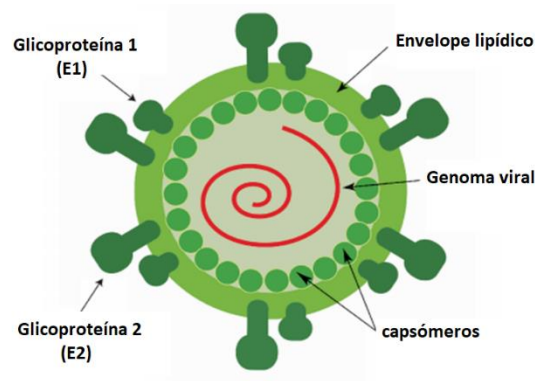


Figura 6. Estrutura da Partícula do vírus da Hepatite C. (*adaptado de Sharma, S.D., 2010*)

A replicação do HCV apenas é possível no interior dos hepatócitos podendo, no entanto, as outras células do hospedeiro funcionar como um reservatório. Para se dirigir às células-alvo (os hepatócitos) o vírus aproveitar-se-á das lipoproteínas do organismo hospedeiro. Desta forma, as glicoproteínas E1 e E2 em conjunto com lípidos e recetores presentes nas membranas das células do hospedeiro serão responsáveis pela entrada celular do vírus, num processo mediado pelas cinases (*Ferreira & Pontarolo, 2017*).

O seu genoma viral é composto por uma cadeia simples de RNA positiva que apresenta um grande quadro de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína, de 3010-3030 aminoácidos, ladeada por duas regiões não codificantes em ambas extremidades (5' e 3'). Esta poliproteína é, durante e após a tradução, processada em 3 proteínas estruturais (core, E1 e E2) e 7 não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (*Echeverría et al., 2021*).

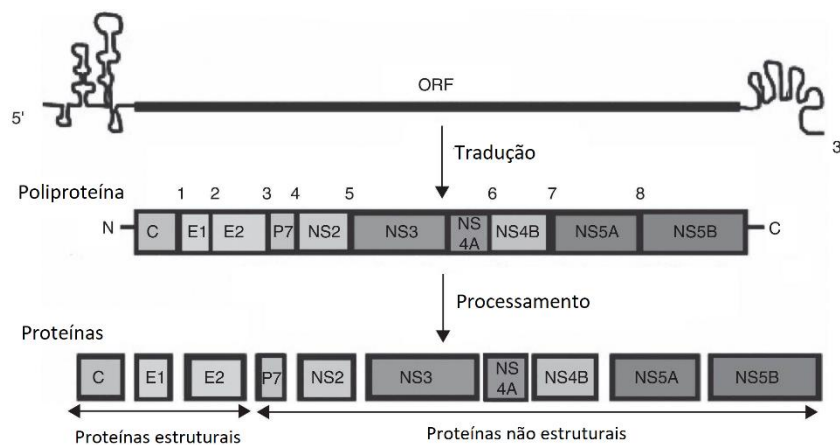


Figura 7. Organização do genoma do HCV. (*adaptado de Sharma, S.D., 2010*)

Sabe-se, então, que os lípidos têm um papel crucial no ciclo de vida do HCV, uma vez que este é um vírus com uma estrutura rica em lípidos e que se liga às LDL e também às HDL para chegar às células alvo e assim entrar nas células hospedeiras e iniciar a sua replicação (*Siagris et al., 2006; Petit et al., 2001; Dai et al., 2015; Hepatitis C Online, n.d.-a*). Por este motivo indivíduos infetados pelo HCV apresentam níveis de colesterol total, triglicéridos, HDL e LDL diminuídos (*Ferreira et al., 2022*).

Genótipos e as suas variantes

O HCV apresenta 8 genótipos diferentes e 93 subtipos confirmados (em março de 2022) (*ICTV. Flaviviridae: Hepacivirus C Classification, Smith et al., 2022*).

Estes diferentes genótipos (GT) e subtipos vão influenciar a patogenicidade, resposta à terapia antiviral e duração do tratamento. A distribuição dos genótipos vai variar de acordo com a rota de transmissão e também com a localização geográfica (*Taherkhani et al., 2017*).

Os genótipos com maior distribuição global são o 1 e o 3 (*Polaris Observatory HCV Collaborators, 2017*). Em Portugal, em particular, foi observada uma prevalência relativamente alta do GT4 (4a, 4b, 4d, 4f e 4k), 16.1%, correspondendo a um valor cerca de 3 vezes superior do que o estimado para toda a Europa Ocidental (*Guntipalli et al., 2021*).

- GT 1 - mais prevalente em indivíduos com historial de transfusões sanguíneas ou procedimentos cirúrgicos
- GT 2 - associado principalmente a infeções hospitalares e tratamentos dentários
- GT 3 - mais frequente em indivíduos toxicod dependentes que utilizam drogas intravenosas
- GT 4 - associado a práticas sexuais inseguras e utilização de drogas intravenosas

(*Taherkhani et al., 2017*)

Ciclo de vida do HCV

As células-alvo deste vírus são os hepatócitos podendo, no entanto, infectar as células mononucleares do sangue periférico, linfócitos B e, também, as células dendríticas (Moradpour et al., 2007). A infecção pelo HCV é um processo bastante dinâmico e com um tempo de semivida viral de poucas horas, havendo a produção de aproximadamente 1012 virões por dia em indivíduos infectados (Sabahi A., 2009).

O primeiro passo do ciclo de vida do vírus é a entrada nas células hospedeiras por endocitose mediada por recetores. Este endossoma é então transportado para o retículo endoplasmático e, devido ao baixo pH no seu interior, dá-se a fusão entre membranas (envelope viral e endossoma), seguida da desencapsidação e libertação do genoma viral para o citoplasma para tradução e replicação viral. (Meng et al., 2015; Moradpour et al., 2007; Hepatitis C Online, n.d.-a).

É na altura da ligação das subunidades ribossomais ao RNA viral, no retículo endoplasmático rugoso, que se inicia a síntese da poliproteína viral com a tradução da ORF do RNA viral e, o seu processamento (pelas proteases celulares e virais) em proteínas estruturais e não estruturais, essenciais para a replicação viral. (Suzuki et al., 2007; Echeverría et al., 2021; Hepatitis C Online, n.d.-a).

A replicação do HCV começa com a síntese de um RNA complementar de cadeia negativa usando o genoma viral como molde que será utilizado para a criação de numerosas cópias de RNA viral de cadeia positiva. Estes RNAs serão ou incorporados em nucleocápsides ou utilizados para tradução e replicação. O processo de replicação é apoiado por múltiplas proteínas não estruturais do HCV (Suzuki et al., 2007; Hepatitis C Online, n.d.-a).

De seguida, as proteínas virais e as cópias de RNA viral têm de ser dispostas de modo a produzirem viriões que sejam infecciosos e encapsulados. Neste sentido é então interrompida a replicação viral e inicia-se a encapsidação, que envolve uma oligomerização da proteína da cápside e agregação do RNA (Suzuki et al., 2007; Hepatitis C Online, n.d.-a).

Uma vez formada a nucleocápside do vírus, este adquire um envelope bilipídico, que advém da célula hospedeira, ao qual se associam as duas glicoproteínas virais (E1 e E2),

e é, posteriormente, libertado por excitose. (Figura 8) (Sharma, S.D., 2010; Amboss, 2023; Ferreira & Pontarolo, 2017; Suzuki et al., 2007; Hepatitis C Online, n.d.-a).

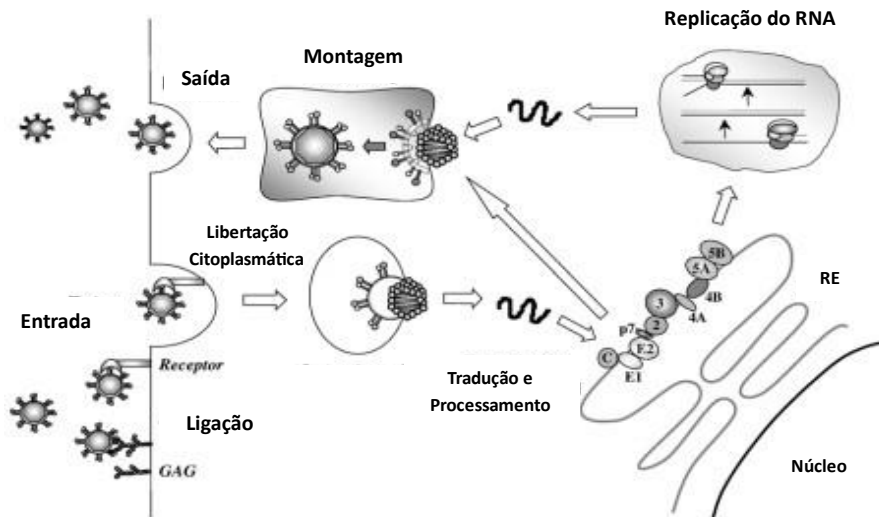


Figura 8. Ciclo de replicação do vírus da hepatite C. (Adaptado de Suzuki et al., 2007)

Transmissão

O HCV transmite-se, principalmente, através do sangue, bastando para tal a exposição a pequenas quantidades de sangue contaminado. Muitos fatores podem estar relacionados com a infecção pelo HCV, podem ser demográficos (idade, sexo, profissão, etc), comportamentais (uso de drogas intravenosas, práticas inseguras de injeção, via sexual ou transmissão vertical, não sendo, no entanto, transmitido através do leite materno), relacionados com os cuidados de saúde e socioeconómicos (cuidados de saúde precários, transfusões de sangue e/ou hemoderivados sem a realização de um rastreio prévio, etc). (WHO, n.d.; Meng et al., 2015; Wuytack et al., 2018).

Hepatite C aguda e crónica

O vírus da hepatite C causa tanto infeção aguda como crónica.

A infeção aguda é habitualmente assintomática e na maioria dos casos não leva a doença com risco de morte. Cerca de 30% (15-45%) das pessoas infetadas eliminam espontaneamente o vírus num período de 6 meses após a infeção, sem qualquer tipo de tratamento. Os restantes 70% (55-85%) irão desenvolver infeção crónica e, uma vez neste estadio, a sua resolução espontânea é rara. Estes indivíduos apresentam um risco entre 15-30% de desenvolverem cirrose hepática, num período de 20 anos, e uma vez no estadio de cirrose, apresentam um risco de 1-4% por ano, de evoluir para carcinoma hepatocelular (CHC). (Figura 9) (*WHO, n.d.; Lingala & Ghany, 2015; Hepatitis C online, n.d.-b)*

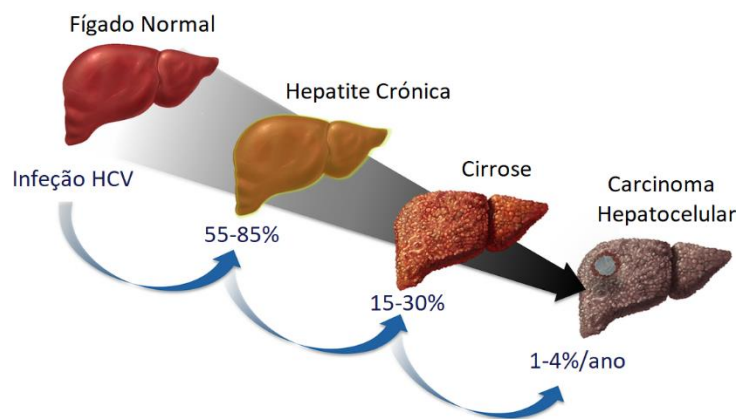


Figura 9. Evolução da infeção pelo vírus da hepatite C (HCV). (*adaptado de U.S.V.A. Health Department, 2018*)

A hepatite C crónica (HCC) é uma síndrome clínica e patológica, definida pela persistência de RNA viral do HCV no sangue por mais de 6 meses após a infeção aguda (*Lingala & Ghany, 2015; Desmet et al., 1994*). É caracterizada por um conjunto de danos crónicos no fígado e acumulação de proteínas da MEC que distorcem a arquitetura hepática, levando à formação de cicatrizes e, subsequentemente, ao desenvolvimento de nódulos, insuficiência hepática e hipertensão portal (*Battaller & Brenner, 2006*). Esta vai desde o estadio 0 (sem fibrose) ao estadio 4 (cirrose) e é, nestes indivíduos, o fator de prognóstico mais importante (*Corchado et al., 2013*). A cirrose é um dos principais precursores para a grande maioria dos casos de cancro hepatocelular, pois a maioria

destes desenvolvem-se em fígados com cirrose estabelecida por várias décadas ([Walter et al., 2011](#); [Bandiera et al., 2016](#)).

O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma neoplasia maligna bastante agressiva e com uma taxa de mortalidade elevada, com origem nas células epiteliais do fígado. A incidência aumenta com a idade (com predomínio entre os 50 - 60 anos) e é duas vezes mais comum no sexo masculino ([Chedid et al., 2017](#); [Walter et al., 2011](#)).

Fatores de risco para a evolução da cronicidade

Os fatores de risco associados ao ritmo da progressão da fibrose e desenvolvimento de CHC incluem fatores do hospedeiro (genética, idade, género, obesidade, esteatose, resistência à insulina/diabetes e a coinfeção por HBV e HIV), fatores virais (genótipo e carga viral) e fatores ambientais (consumo de álcool, tabaco e atividade física). ([Lingala & Ghany, 2015](#); [VA.gov., 2018](#); [Bataller & Brenner, 2005](#); [Ferreira et al., 2023](#))

Fatores do Hospedeiro

Idade

Sabe-se que o avançar da idade tem um papel importante na progressão e desfecho da HCC, tendo sido, também, demonstrado em alguns estudos que quando existe infeção pelo HCV em idades acima dos 40 anos a progressão para estadios mais elevados de fibrose é mais rápida ([Lingala & Ghany, 2015](#); [Nadir & Brenner, 2014](#)). As razões para a existência destas diferenças na progressão da fibrose não são claras, mas acredita-se que pode ser devida às alterações que existem nos mecanismos fisiológicos e/ou imunológicos com o avançar da idade, tais como:

- Diminuição do volume hepático e do fluxo sanguíneo hepático;
- Diminuição da resposta imunológica;
- Menor biodisponibilidade dos sistemas antioxidantes, levando ao aumento do stresse/sensibilidade hepática aos compostos reativos de oxigénio e aos radicais de aldeídos formados durante a peroxidação lipídica que, por sua vez, podem induzir a expressão de citocinas pró-fibróticas e pró-inflamatórias levando ao

aumento da síntese de colagénio por parte das células estreladas hepáticas (*Minola et al., 2002*).

- Maior carga de comorbilidades ou exposição a fatores associados com a progressão da fibrose (*Lingala & Ghany, 2015*).
- Encurtamento dos telómeros dos hepatócitos, levando assim à sua senescência, perda de funções, incapacidade de regeneração hepatocelular e, como tal, uma resposta fibrótica maior em situação de lesão hepática (*Pradat et al., 2007*).

Género

Também em vários estudos é demonstrado que o sexo feminino tem uma maior taxa de resolução espontânea (45%) da infeção aguda, em comparação com o sexo masculino que, por sua vez, apresenta também maior risco de progressão para doença hepática avançada, cirrose e CHC. Aponta-se para as diferenças hormonais entre sexos para explicar estes resultados, estando os níveis séricos mais elevados de testosterona associados a estadios mais graves de fibrose hepática e, por outro lado, o papel protetor do estrogénio. Resultados obtidos in vitro sugerem que o estrogénio modifica a produção da MEC e que, por sua vez, vai atenuar a ativação das células estreladas hepáticas (*Lingala & Ghany, 2015*).

Em comparação com o sexo feminino, os indivíduos do sexo masculino têm níveis de HDL bastante mais baixos, porém sem diferenças significativas no estadio e progressão da doença hepática. Ramcharran D et al. verificaram correlações entre níveis séricos baixos de LDL e a esteatose, a progressão da fibrose e com a não resposta à terapêutica, sendo os níveis basais mais elevados de LDL bons preditores duma resposta sustentada à terapêutica. (*Ferreira et al., 2022*)

A infeção por HCV está associada à alteração da expressão dos genes envolvidos no metabolismo lipídico e pode explicar algumas diferenças entre os géneros.

Obesidade

A obesidade é um fator de risco independente para a progressão da fibrose e o desenvolvimento de cirrose, havendo estudos que demonstraram que indivíduos com IMC > 25 kg/m² tinham uma rápida progressão da fibrose (*Ortiz et al., 2002*) e, também, que este contribuía para a não resposta a terapias antivirais (*Bressler et al., 2003*).

Esteatose

É uma doença, com alguma prevalência na população em geral, sendo duas a três vezes mais comum em indivíduos com HCC, variando entre 42-70%. Esta promove o desenvolvimento de fibrose e acelera a sua progressão para cirrose, aumenta o risco de CHC e diminui a resposta à terapia com interferão. A esteatose hepática não alcoólica (NASH) é uma forma mais avançada de esteatose e, por isso, quando associada a HCC pode resultar numa ainda mais rápida progressão da doença hepática. Como tal, é recomendado que indivíduos com HCC tentem manter um IMC ideal ([Lingala & Ghany, 2015](#)).

Resistência à insulina /Diabetes

A diabetes mellitus é uma comorbilidade comum em indivíduos com HCC tendo uma prevalência entre 24-62%. O desenvolvimento de resistência à insulina/diabetes em doentes com HCC é complexa e parece estar relacionada com a presença de síndrome metabólico e também como resultado da infeção viral, ambas as quais podem independentemente levar ao desenvolvimento de cirrose.

Duas meta-análises sugeriram uma forte associação entre a HCC e o desenvolvimento de resistência à insulina ([White et al., 2008](#); [Naing et al., 2012](#)). Contudo, estudos posteriores não encontraram essa associação, mas sim entre estas e níveis elevados de ALT e GGT, sugerindo que a inflamação, por si só, pode ser a causa da resistência à insulina /diabetes ([Ruhl et al., 2014](#)). Curiosamente, a erradicação do HCV tem sido associada à melhoria ou mesmo à reversão da resistência à insulina e diabetes ([Romero-Gomez et al., 2008](#); [Butt et al., 2012](#); [Delgado-Borrego et al., 2010](#); [Kim et al., 2009](#)).

Estas entidades estão associadas a uma progressão mais rápida da fibrose, ao aumento do risco de cirrose e suas complicações, incluindo CHC, e a uma menor resposta à terapia em indivíduos com HCC. Outros estudos concluíram que a diabetes inaugural é um preditor independente de cirrose e descompensação hepática e também, em indivíduos com cirrose, um fator de risco independente para transplante hepático e morte. Esses achados sugerem que um melhor controlo da diabetes /resistência à insulina possa levar a melhores desfechos em indivíduos com HCC, incluindo aqueles com cirrose. ([Lingala & Ghany, 2015](#))

A esteatose hepática associada à obesidade e aumento dos níveis de insulina circulante parecem contribuir para progressão da fibrose na HCC independentemente do genótipo (Lingala & Ghany, 2015).

Fatores Virais

Carga Viral

A carga viral tende a manter-se estável ao longo do tempo e, normalmente, em indivíduos com HCC varia entre 10⁴-10⁸ cópias/ml. Existem poucas evidências que indiquem que esta afeta a evolução da HCC, contudo, é um valor preditivo da resposta ao tratamento, em que quanto menor a carga viral maior a taxa de resposta associada. (Lingala & Ghany, 2015; U.S.V.A. Health Department, 2018)

Genótipo do HCV

A depuração espontânea é observada com maior frequência na infecção pelo GT1, no entanto, quando tal não acontece existe uma progressão mais agressiva da doença comparativamente aos outros genótipos. Um estudo sugeriu que o GT3 pode estar associado a um maior grau de esteatose e aceleração da progressão da fibrose e, também, a uma maior incidência de cirrose e CHC. Contudo, a associação entre genótipo e progressão da doença ainda não é clara. (Lingala & Ghany, 2015; U.S.V.A. Health Department, 2018)

A utilidade clínica mais importante do genótipo é na escolha da terapêutica (Lingala & Ghany, 2015).

Fatores Ambientais

Álcool

Não existem evidências suficientes que determinem a existência de uma quantidade segura de consumo de álcool. Por esse motivo, os pacientes devem ser informados sobre os efeitos adversos do álcool na HCC e aconselhada a não ingestão. O mecanismo pelo qual o álcool causa a mais rápida progressão da doença hepática não é claro, porém, alguns dos mecanismos que podem influenciar são a disfunção imunológica, aumento da replicação viral, surgimento de *quasispecies* de HCV, apoptose, esteatose e aumento da sobrecarga de ferro. (Lingala & Ghany, 2015)

Marcadores de doença hepática

Enzimologia hepática

A doença hepática causada por HCV traduz-se em alterações estruturais do fígado que levam a diferentes estádios de fibrose e ao aumento de biomarcadores séricos de lesão hepática, inflamação, necrose e fibrose *(Kim et al., 2008; Ferreira et al., 2023)*.

A AST normalmente está relacionada com a ALT e está demonstrado que um aumento da proporção AST/ALT está relacionada com estádios de fibrose mais avançados, sendo por isso utilizada com ferramenta de avaliação do estadió de fibrose em vários estudos. Por esse motivo, é recomendada a sua utilização como ferramenta de diagnóstico na identificação de estádios elevados de fibrose em indivíduos com HCC. *(Zechini et al., 2004; Lingala & Ghany, 2015)*

A ALT é uma enzima que se encontra em abundância no citoplasma dos hepatócitos e, tal como a AST, é um biomarcador de lesão hepática *(Kim et al., 2008; Lingala & Ghany, 2015)*. Indivíduos com HCV possuem, habitualmente, níveis elevados desta enzima que, por sua vez, estão associados a um risco aumentado da progressão para HCC e mortalidade *(Lingala & Ghany, 2015)*. Fujiwara A., et al demonstrou que níveis elevados de ALT vão levar a uma rápida progressão da fibrose, alcançando estádios avançados num período de 4-5 anos. Por esse motivo a monitorização desta enzima é aconselhável e bastante importante *(Lingala & Ghany, 2015; Shahid et al., 2014; Fujiwara et al., 2008)*.

No estudo por Ferreira et al., foi reportado altos níveis de ALP, AST e ALT com estádios de fibrose mais avançados, antes e após terapêutica com antivirais de ação direta (DAA). *(Ferreira et al., 2023)*

Plaquetas

Têm um papel fundamental na hemostasia, nomeadamente no início da cascata da coagulação em resposta à lesão vascular. Contudo, para além da coagulação, estas células têm uma vasta variedade de funções que pode ser explicada pela grande quantidade de proteínas que conseguem sintetizar. Quando existem lesões hepáticas estas são ativamente recrutadas para o fígado, tendo um papel fundamental na

regeneração tecidual ([Pavlovic et al., 2019](#); [Ferreira et al., 2023](#)). Um número de plaquetas mais elevado está associado à melhoria da fibrose hepática, salientando a importância destas na regeneração hepática após a eliminação do vírus ([Ferreira et al., 2023](#)). A trombocitopenia em indivíduos com HCC é causada pelo sequestro esplênico condicionado pela hipertensão portal, pela produção reduzida de trombopoietina e pela diminuição da função hematopoiética, da medula óssea, condicionada pelo consumo excessivo de álcool ou pelo HCV, apresentando estas células um tempo de semi-vida mais reduzido ([Pereboom et al., 2008](#); [Kurokawa & Ohkohchi, 2017](#); [Ferreira et al., 2023](#)).

IMC

Reyz et al., verificaram que, no caso do “*agouti-related peptide*” (AGRP), o sindecano-3 é expresso e liga-se à membrana celular em situação de balanço energético negativo e, aquando da reingestão alimentar e, possivelmente, pelos altos níveis plasmáticos de leptina e insulina, o sindecano-3 é clivado da membrana celular o que poderá modificar a estrutura dos terminais pré-sinápticos e diminuir a capacidade antagonista da AGRP no MC4R. ([Reizes et al., 2006](#)). Posteriormente Karlsson-Lindahl et al. confirmaram que a HPSE tem um efeito nervoso central anorexigénio, através do sistema da melanocortina, atuando como um modulador negativo, através da quebra de cadeias de HS que se pensa estarem ligadas ao sindecano-3. Nos ratinhos com deleção da HPSE verificou-se um aumento da ingesta alimentar e obesidade relacionada com a idade, com um aumento de até 40% da massa gorda. Por outro lado, a sobreexpressão de HPSE traduziu-se em ratinhos com menor ingesta alimentar e com níveis de massa gorda baixos ([Karlsson-Lindahl et al., 2012](#)).

Variantes genéticas polimórficas

Os polimorfismos genéticos são variações na sequência de DNA e que ocorrem em mais de 1% da população. Este termo refere-se à presença de diferentes genótipos/alelos de um gene específico e pode ocorrer como um polimorfismo de nucleótido único (SNP), inserção/deleção, “*variable number tandem repeat*” (VNTRs) e variações microssatélites ([Karki et al., 2015](#)).

Os SNPs são o tipo de polimorfismos mais comum e geralmente são encontrados em áreas que flanqueiam os genes codificadores de proteínas importantes para a ligação do microRNA e, também, para a regulação da expressão génica localizando-se nas sequências de codificação, intrões ou regiões intergénicas. Este tipo de polimorfismo pode influenciar a expressão génica, estabilidade do RNAm, processamento alternativo, sequência alvo do microRNA, a exportação de proteínas para o retículo endoplasmático e, também, alterar a função das proteínas quando existe troca de um aminoácido ([Cebinelli et al., 2016](#); [Shastry, B. S., 2006](#)). SNPs localizados em regiões de regulação génica frequentemente facilitam a progressão de diversas doenças. São bons marcadores genéticos quando correlacionados com o fenótipo das doenças, estando localizados em genes conhecidos e associados a mutações causadas por estas. Também ajudam a identificar genes ou loci que contribuem para a suscetibilidade de doenças comuns complexas. A identificação de SNPs funcionais, incluindo os da HPSE, em indivíduos saudáveis, permite a elucidação das normais funções dum gene em várias células ativadas e não ativadas e o envolvimento da proteína codificada por este gene em processos normais. Os SNPs funcionais influenciam vários processos patológicos como o desenvolvimento e progressão do cancro, inflamação aguda e crónica, resistência a tratamentos e a risco elevado de complicações de tratamento ([Vlodavsky et al., 2020, Chapter 8](#); [Ostrovsky et al., 2020](#)).

Polimorfismos da HPSE

Até 2018 foram descobertos 9746 SNPs no gene da HPSE. Durante 12 anos foram analisados 21 SNPs em amostras normais e patológicas. A *Figura 10* mostra todos os SNPs que foram investigados, apresentando a negrito os mais proeminentes.

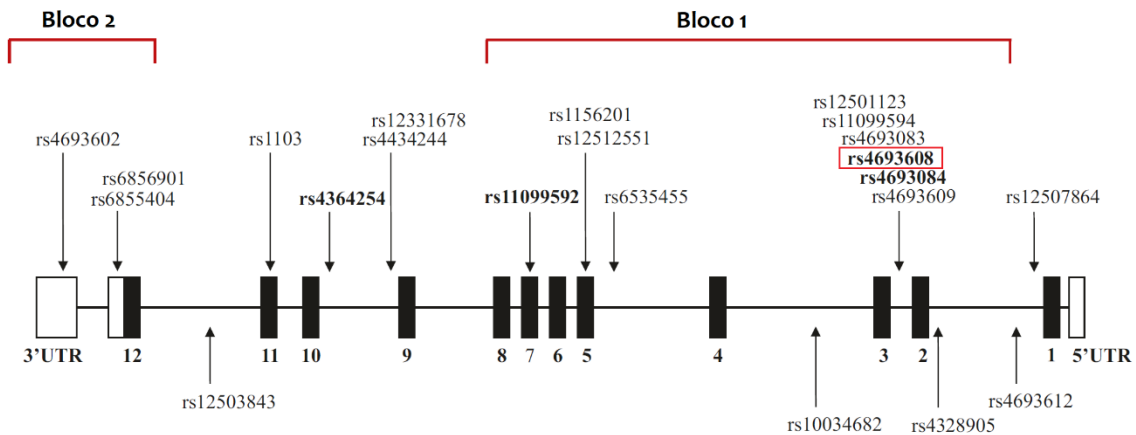


Figura 10. Mapa de SNPs do gene da HPSE. Retângulos pretos representam os 12 exões. Retângulos brancos representam as regiões não codificantes 5' e 3'. A negrito estão os SNPs mais proeminentes. As setas mostram a localização dos SNPs. (*adaptado de Vlodavsky et al., 2020, chapter 8*)

Verificou-se também desta análise que a combinação dos SNPs rs4693608 e rs4364254 tem uma correlação significativa com a expressão do RNAm da HPSE e a expressão da HPSE (*Vlodavsky et al., 2020, Chapter 8; Ostrovsky et al., 2020*).

Vários estudos sugerem que os SNPs no gene da HPSE e a sobreexpressão da HPSE estão associados a processos inflamatórios e autoimunes, fibrose, diabetes, disfunção renal e a várias formas invasivas de cancro (*Ostrovsky et al., 2018; Ostrovsky et al., 2020; Vlodavsky et al., 2020, Chapter 8*). A HPSE ao quebrar as membranas basais epiteliais e endoteliais, produz maior permeabilidade vascular e extravasamento leucocitário e, também, liberta as citocinas e fatores de crescimento ligados ao HS (normalmente sequestrados na MEC), promovendo assim a angiogénese e inflamação na área circundante. Ainda assim, a maioria dos estudos sobre HPSE tem-se focado no seu papel no cancro, especialmente na metastização, pela degradação de um dos principais constituintes da MEC, os HS. (*Vlodavsky et al., 2020, Chapter 32; Angelidis & Shukla, 2020; Ostrovsky et al., 2018*).

Os resultados do estudo de Huang et al. (2012) demonstram que em várias variantes genéticas a condicionar perda de heterozigotia, a redução das expressões da HPSE

(citoplasmática e nuclear) e do RNAm, em células hepáticas cancerígenas, estão correlacionadas com a progressão tumoral e um prognóstico desfavorável no carcinoma hepatocelular (CHC), reportando também a HPSE nuclear como favorável no prognóstico da doença. No entanto, existem também vários estudos que relacionam a elevada expressão da HPSE em vários tumores. Estes resultados controversos podem ser explicados devido às diferentes localizações subcelulares que a HPSE pode ter (núcleo, citoplasma e superfície celular), níveis de expressão (baixa, moderada e alta) e atividades da HPSE (enzimática e não enzimática), porque poderá ter efeitos, níveis de expressão e atividades distintas em diferentes locais. [\(Huang et al., 2012; Vlodayvsky et al., 2020, Chapter 8; Ostrovsky et al., 2020\)](#)

Na hepatite C crónica, a HPSE é expressa em níveis elevados e está relacionada com estadios iniciais de fibrose [\(Lv et al., 2016\)](#). No CHC é relatada uma maior expressão da HPSE em indivíduos com o HCV em comparação com os indivíduos sem a presença do HCV, assim pode-se assumir que este vírus favorece a expressão da HPSE [\(Dong S., 2010\)](#).

Vários polimorfismos funcionais de nucleótideo único (SNPs) foram identificados no gene da HPSE, sendo o polimorfismo rs4693608 o mais proeminente. Este polimorfismo tem a presença de dois alelos, o alelo A e o alelo G, tendo o alelo A uma maior frequência comparativamente ao alelo G.

Ostrovsky et al. verificaram que neste polimorfismo, a HPSE se liga ao intensificador, no intrão 2, e regula a sua expressão via feedback negativo, o que permite explicar a correlação inversa entre a expressão de RNAm e os níveis de HPSE plasmática. Verificaram, também, que esta se liga a ambos os alelos (A e G) apresentando maior afinidade pelo alelo G em comparação com o alelo A. Sendo o genótipo AA identificado como o que apresenta maiores níveis de expressão de RNAm da HPSE e baixos níveis de HPSE plasmática em contraste com o genótipo GG que apresenta níveis menores de expressão do RNAm da HPSE e altos níveis plasmáticos da HPSE. O genótipo AG está associado a uma expressão intermediária [\(Ostrovsky et al., 2018; Ostrovsky et al., 2020\)](#). O nível de HPSE nuclear está também relacionado com o SNP rs4693608, encontrando-se mais elevada nos indivíduos com genótipo GG comparativamente aos AA [\(Ostrovsky et al., 2018; Ostrovsky et al., 2020\)](#).

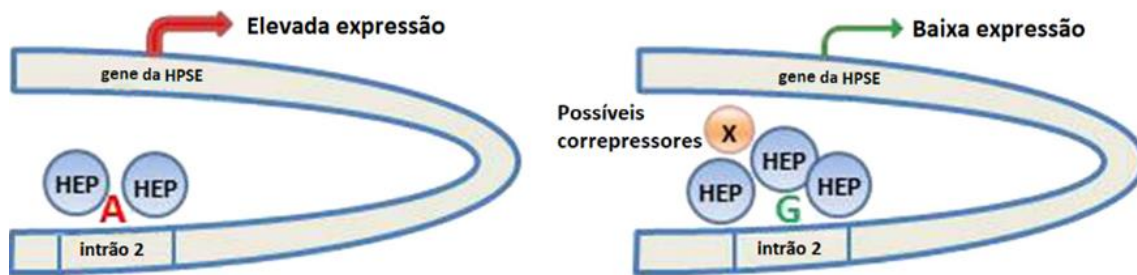


Figura 11. Modelo da regulação da expressão do gene da HPSE. (*adaptado de Ostrovsky et al., 2018*)

A heparanase liga-se à região de regulação da expressão génica do intrão 2 e regula a expressão por feedback negativo no polimorfismo HPSE A/G. Como a HPSE tem maior afinidade para o alelo G, há um maior número de moléculas ligadas a este. Como resultado a expressão génica de HPSE será maior nos indivíduos AA vs. indivíduos GG. Correpressores adicionais poderão ser recrutados para o complexo proteína-DNA, suprimindo ainda mais a expressão génica da HPSE.

A análise da expressão da HPSE em células mononucleares não revelou diferenças entre os indivíduos com diferentes genótipos do gene da HPSE assumindo assim que este tipo de correlação é restrita aos neutrófilos (*Ostrovsky et al., 2020*). São necessários mais estudos para esclarecer como a substituição A - G condiciona um feedback negativo na regulação da expressão da HPSE. Assumiu-se que correpressores adicionais podem participar nesse regulamento e que a ligação da heparanase ao intensificador do próprio gene da HPSE poderia explicar o efeito do RS4693608 SNP na sua expressão (*Ostrovsky et al., 2018*).

Pensa-se que a paragem da normal autorregulação pela HPSE e ligação do HTLF à região intensificadora do gene da HPSE leva à translocação da HPSE do núcleo para o citoplasma e MEC e pode funcionar como mecanismo de escape das células malignas à morte celular imunomediada, contribuindo assim para a carcinogénese e progressão tumoral. Esta hipótese é suportada por Cohen et al. mostrando que a HPSE citoplasmática está associada a um pior prognóstico enquanto a HPSE nuclear prediz um prognóstico mais favorável em indivíduos com cancro do pulmão. (*Ostrovsky et al., 2018; Ostrovsky et al., 2020*).

Objetivos do trabalho

Como foi referido anteriormente, o vírus da hepatite C é a causa mais comum de doença hepática em todo o mundo. O HCV vai levar a um estado inflamatório do fígado insidioso e com tendência para estadios de fibrose bastante elevados, levando assim a doença crónica. Sabe-se que existem muitos fatores que influenciam o risco de fibrose hepática, tais como, fatores do hospedeiro (idade, sexo, genética, etc), fatores virais (carga viral, genótipo, etc) e fatores ambientais (álcool, tabagismo, etc).

O estudo genético foi realizado no âmbito do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), pela aluna Mariana Oliveira, com supervisão laboratorial da Dr^a. Joana Ferreira (estudante de Doutoramento do ISAMB) e sob orientação dos Professores Doutores Manuel Bicho e Fátima Serejo.

Objetivo principal desta revisão é determinar se o polimorfismo genético do gene da HPSE (A/G) - rs4693608 - influencia a história natural da hepatite C com progressão para os estadios de fibrose mais avançados.

Objetivos específicos:

- influência deste polimorfismo genético na suscetibilidade para a hepatite C crónica
- relação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos, metabólicos, bioquímicos e celulares com o estadio de fibrose
- relação destes parâmetros com o polimorfismo genético do gene da HPSE (A/G)
 - relação do IMC e carga viral com os genótipos e estadio de fibrose

Materiais e métodos

Caracterização da Amostra Populacional

Este estudo contou com a participação de 329 indivíduos com Hepatite C Crónica, seguidos nas consultas de Hepatologia, do Centro Hospitalar Lisboa Norte – Hospital Santa Maria (CHLN-HSM), pela Prof^a. Doutora Fátima Serejo. Apresentavam uma idade média de 48,93 anos, IMC médio de 25,25 kg/m² e uma distribuição por sexo de 62,30% homens e 37,70% mulheres.

Durante a avaliação clínica dos doentes foram recolhidos parâmetros antropométricos e sociodemográficos e foi realizada a colheita de sangue periférico para avaliações bioquímicas e genéticas.

Critérios de Inclusão/Exclusão

Critérios de inclusão:

- Hepatite C Crónica
- Idade \geq 18 anos
- Consentimento informado e esclarecido

Critérios de exclusão:

- Outras doenças crónicas do fígado (hepatite viral A e B)
- Doenças autoimunes e outras doenças genéticas e/ou metabólicas
- Coinfeção por HIV
- Consumo de álcool >40 g/dia
- Mulheres grávidas
- Indivíduos com capacidade intelectual comprometida

Parâmetros recolhidos

Parâmetros Antropométricos e Sociodemográficos

Os parâmetros antropométricos recolhidos foram o peso, em quilogramas (kg) e a altura, em metros (m), e com estes realizou-se o cálculo do índice de massa corporal (IMC), sendo categorizado, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), como:

- baixo peso – $<18.5 \text{ kg/m}^2$
- peso normal – 18.5 a 24.9 kg/m^2
- excesso de peso – 25 a 29.9 kg/m^2
- obesidade – $\geq 30 \text{ kg/m}^2$

Os parâmetros sociodemográficos recolhidos foram o sexo e a idade.

Parâmetros Metabólicos, Celulares e Virais

Os parâmetros metabólicos recolhidos, abaixo mencionados, foram analisados através de métodos de análise padronizados, considerando-se os seguintes valores de referência e unidades de medida:

- Genótipo do HCV;
- Carga viral (HCV-RNA) – UI/mL
- Plaquetas – [150.000; 450.000] U/ μL ;
- Fosfatase alcalina (ALP) – [35; 105] UI/L
- Aspartato aminotransferase (AST) – [0; 32] UI/L;
- Alanina aminotransferase (ALT) – [0; 33] UI/L;
- Gama-glutamil-transpeptidase (GGT) – [0; 40] UI/L;

Avaliação Fenotípica da fibrose

A avaliação do estadió de fibrose foi realizada por elastografia hepática transitória, recorrendo ao equipamento FibroScan® (Echosens, Paris, França).

O Fibroscan® mede a elasticidade do tecido hepático utilizando ondas de ultrassom (5MHz) e ondas de baixa frequência (50Hz), cuja velocidade de propagação está diretamente relacionada com a elasticidade do tecido hepático (*Sandrine t al., 2003*).

Foram utilizados valores de corte validados pelo Serviço de Gastroenterologia e Hepatologia, do CHLN-HSM (análise de 110 pacientes, classificação Scheuer): (*Serejo et al., 2007*)

- 5,43 kPa – F \geq 2 (PPV 0,78; VPL 0,67)
- 8,18 kPa – F \geq 3 (PPV 0,95; NPV 0,93)
- 10,08 kPa – F=4 (PPV 0,93; NPV 0,93)

Caracterizando-se, assim, a fibrose em 4 estadios:

- F1 – ligeira
- F2 – moderada
- F3 – intensa
- F4 – cirrose

Estudos Genéticos

O DNA genómico foi extraído utilizando um método de extração não enzimático, adaptado do método descrito por *Lahiri and Nurnberger (Lahiri & Nurnberger, 1991)*.

O polimorfismo do gene HPSE A/G foi determinado pela técnica de *Endpoint genotyping*, que combina a metodologia PCR com um mecanismo de deteção e quantificação por fluorescência.

A genotipagem foi realizada pela Dr^a. Mariana Oliveira, MSC, sob supervisão da Dr^a. Joana Ferreira, BSC, estudante de doutoramento do Programa Doutoral EnviHealth &Co do Instituto de Saúde Ambiental (Grupo Ecogenética e Saúde Humana), no Laboratório de Genética da FMUL e no Instituto de Investigação Científica Bento da Rocha Cabral.

Análise Estatística

Realizada pela Dr^a. Mariana Oliveira, MSC, sob supervisão da Dr^a. Joana Ferreira, BSC.

A análise estatística dos dados foi realizada por SPSS 24.0 para Windows (IBM, Nova York, EUA). Os parâmetros metabólicos foram tratados como variáveis contínuas e, também, transformados em variáveis categóricas, estabelecendo grupos estatísticos de acordo com os valores de referência do laboratório de análises.

Foram estabelecidos dois grupos para a análise da fibrose hepática:

- F1/2 – agrupando os doentes com fibrose ligeira e moderada
- F3/4 – agrupando os doentes com fibrose intensa e cirrose

O polimorfismo estudado foi analisado estatisticamente segundo três modelos:

- Codominante - três grupos (GG, AG e AA)
- Recessivo - agrupando os genótipos heterozigoto (AG) e recessivo (AA)
- Dominante - agrupando os genótipos heterozigoto (AG) e dominante (GG)

A análise descritiva foi realizada assumindo análise uni e bivariada. As variáveis contínuas foram analisadas recorrendo a testes não paramétricos e descritas utilizando a média e o intervalo de confiança a 95%. As variáveis categóricas foram descritas utilizando frequências absolutas e relativas. Na análise bivariada, as comparações entre variáveis categóricas foram realizadas pelo teste do Qui-Quadrado ou pelo teste exato de Fisher e o *Odds Ratio* (OR) foi calculado com os seus respetivos intervalos de confiança. Para as variáveis contínuas as comparações estatísticas foram realizadas pelos testes não paramétricos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis e foram ainda efetuadas correlações entre as variáveis contínuas.

Foram considerados resultados estatisticamente significativos para um *p-value* <0,05.

Resultados

As tabelas 1 a 3 resumem as características da população em estudo.

Tabela 1. Características sociodemográficas, virais e hepáticas (variáveis categóricas).

Parâmetros		n	%
Sexo	Masculino	205	62,30
	Feminino	124	37,70
	T	329	100
Genótipos do HCV	GT ₁	209	67,60
	GT ₂	4	1,30
	GT ₃	63	20,40
	GT ₄	32	10,40
	GT ₆	1	0,30
	T	309	100
	GT ₄₊₁	241	78,20
	GT ₃₊₂	67	21,80
T	308	100	
Esteatose	0	68	56,20
	1	26	21,50
	2	14	11,60
	3	13	10,70
	T	121	100
	0+1	94	77,69
	2+3	27	22,31
	T	121	100
Fibrose	F ₁	84	25,50
	F ₂	130	39,50
	F ₃	35	10,60
	F ₄	80	24,40
	T	329	100
	F _{1/2}	214	65,00
	F _{3/4}	115	35,00
	T	329	100

n – número de indivíduos analisados.

Tabela 2. Características sociodemográficas, antropométricas, virais, celulares e bioquímicas (variáveis contínuas)

Parâmetros	Unidades de Medida	n	Média	[IC 95%]
Idade	Anos	328	48,93	[47,57-50,28]
IMC	kg/m ²	291	25,25	[24,80-25,06]
RNA	UI/mL	293	2,16E ⁺⁰⁶	[1,51E ⁺⁰⁶ -2,82E ⁺⁰⁶]
Plaquetas	U/μL	302	2,05E ⁺⁰⁵	[1,97E ⁺⁰⁵ -2,13E ⁺⁰⁵]
ALP	UI/L	294	79,52	[75,73-83,31]
AST	UI/L	317	63,06	[57,98-68,15]
ALT	UI/L	318	92,53	[83,71-101,36]
GGT	UI/L	316	77,48	[67,93-87,03]

n – número de indivíduos; IC – intervalo de confiança

Associação do polimorfismo HPSE A/G com a suscetibilidade para o desenvolvimento de HCC

Recorreu-se aos testes de independência do qui-quadrado de Pearson e de Fisher para identificar possíveis diferenças entre a distribuição alélica e genótipos do polimorfismo da HPSE (A/G) na população com HCC (estudo), população europeia (valores obtidos na literatura) e população portuguesa (grupo controlo).

Tabela 3. Associação das populações (controlo, europeia e estudada) com os alelos do polimorfismo HPSE A/G

Polimorfismo	alelo	Grupo de controlo**		População Europeia		População estudada		p*
		n	%	n	%	n	%	
HPSE A/G	A	125	50,4	65383	52,90	109	47,81	0,225
	G	123	49,6	58215	47,10	119	52,19	
	T	248	100	123598	100	228	100	

n – número de indivíduos analisados; HPSE – Heparanase; T – total

* Teste de qui-quadrado de Pearson

**Estudo realizado por Silva, et al., 2023, Laboratório de genética da FMUL

Tabela 4. Associação das populações (controlo e estudada) com os genótipos do polimorfismo HPSE A/G

Polimorfismo	genótipo	População estudada		Grupo de controlo**		p*
		n	%	n	%	
HPSE A/G	GG	32	28,07	33	26,61	0,804
	AG	55	48,25	57	45,97	
	AA	27	23,68	34	27,42	
	T	114	100	124	100	

n – número de indivíduos analisados; HPSE – Heparanase; T – total

* Teste de Fisher

**Estudo realizado por Silva, et al., 2023, Laboratório de genética da FMUL

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na associação deste polimorfismo com a suscetibilidade para o desenvolvimento de HCC.

Associação dos parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos com o estadio de fibrose

Tabela 5. Associação dos estadios de fibrose com os parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos (variáveis contínuas).

Parâmetros	Unidade de medida	F1/2		F3/4		p*
		média	[IC 95%]	média	[IC 95%]	
Idade	anos	47,13	[45,49-48,77]	52,25	[49,95-54,55]	0,001
IMC	Kg/m ²	24,93	[24,38-25,48]	25,85	[25,07-26,64]	0,080
RNA	UI/ml	2,12E ⁺⁰⁶	[1,21E ⁺⁰⁶ -3,04E ⁺⁰⁶]	2,23E ⁺⁰⁶	[1,43E ⁺⁰⁶ -3,04E ⁺⁰⁶]	0,073
Plaquetas	U/microL	2,22E ⁺⁰⁵	[2,13E ⁺⁰⁵ -2,31E ⁺⁰⁵]	1,75E ⁺⁰⁵	[1,61E ⁺⁰⁵ -1,90E ⁺⁰⁵]	<0.001
ALP	UI/L	72,06	[68,60-75,51]	93,15	[85,03-101,28]	<0.001
AST	UI/L	49,67	[45,48-53,86]	88,26	[77,27-99,26]	<0.001
ALT	UI/L	79,91	[70,34-89,48]	116,07	[98,79-133,36]	<0.001
GGT	UI/L	55,26	[48,86-61,66]	118,53	[95,74-141,33]	<0.001

*Teste Mann-Whitney

Verificaram-se resultados estatisticamente significativos, para os parâmetros: idade, plaquetas, ALP, AST, ALT e GGT.

- Indivíduos com estadios de fibrose mais elevados têm, em média, idade mais avançada, valores aumentados de ALP, AST, ALT e GGT e diminuídos de plaquetas.

Tabela 6. Associação dos estadios de fibrose com os parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos (variáveis categóricas).

Parâmetros	Valores referência	F1/2		F3/4		p*	OR	[IC 95%]
		n	%	n	%			
Sexo	Masculino	130	60,75	75	65,22	0,475	NA	—
	Feminino	84	39,25	40	34,78			
	T	214	100	115	100			
IMC	<25	112	59,57	59	57,28	0,711	NA	—
	≥25	76	40,43	44	42,72			
	T	188	100	103	100			
Genótipos do HCV	GT4+1	156	77,61	85	79,44	0,773	NA	—
	GT3+2	45	22,39	22	20,56			
	T	201	100	107	100			
RNA	<400.000	96	50,26	41	40,20	0,111	NA	—
	≥400.000	95	49,74	61	59,80			
	T	191	100	102	100			
	<600.000	81	42,41	35	34,31	0,210	NA	—
	≥600.000	110	57,59	67	65,69			
T	191	100	102	100				
Plaquetas	<150.000	21	10,94	42	38,18	<0,001	0,199	[0,110- 0,360]
	≥150.000	171	89,06	68	61,82			
	T	192	100	110	100			
ALP	≤105	186	97,89	91	87,50	<0,001	6,643	[2,107-20,945]
	>105	4	2,11	13	12,50			
	T	190	100	104	100			
AST	≤34	171	82,61	48	43,64	<0,001	6,135	[3,645- 10,327]
	>34	36	17,39	62	56,36			
	T	207	100	110	100			
ALT	≤49	153	73,91	58	52,25	<0,001	2,589	[1,595-4,204]
	>49	54	26,09	53	47,75			
	T	207	100	111	100			
GGT	≤38	96	46,83	18	16,22	<0,001	4,550	[2,562-8,082]
	>38	109	53,17	93	83,78			
	T	205	100	111	100			

*Teste de Fisher

Verificaram-se resultados estatisticamente significativos, para os parâmetros: plaquetas, ALP, AST, ALT e GGT.

- Indivíduos com plaquetas <150.000 U/μL estão associados a estadios de fibrose mais elevados (F3/4).
- Indivíduos com ALP >105 UI/L têm um risco 6,64 vezes maior de apresentar um estadio de fibrose F3/4 do que os indivíduos dentro do VR;
- Indivíduos com AST >34 UI/L têm um risco 6,14 vezes maior de apresentar um estadio de fibrose F3/4 do que os indivíduos dentro do VR;
- Indivíduos com ALT >49 UI/L têm um risco 2,59 vezes maior de apresentar um estadio de fibrose F3/4 do que os indivíduos dentro do VR;
- Indivíduos com GGT >38 UL/mL têm um risco 4,55 vezes maior de apresentar um estadio de fibrose F3/4 do que os indivíduos dentro do VR.

Associação polimorfismo genético da HPSE com o estadio de fibrose

Tabela 7. Associação do estadio de fibrose com os parâmetros genéticos

Polimorfismo	Genótipo	F1/2		F3/4		p*	OR	[IC 95%]
		n	%	n	%			
HPSE A/G	GG	24	33,33	8	19,05	0,103	—	—
	AG	35	48,61	20	47,62			
	AA	13	18,06	14	33,33			
	T	72	100	42	100			

*Teste de independência do qui-quadrado de Pearson

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na associação deste polimorfismo com o estadio de fibrose.

Foi realizado o agrupamento dos genótipos segundo os modelos dominante e recessivo, e apesar de não terem sido também observadas diferenças estatisticamente significativas, verificou-se uma tendência para um aumento de indivíduos GG/AG (modelo dominante) no grupo F1/2 ($p=0,060$).

Associação dos parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos com o polimorfismo HPSE A/G

Tabela 8. Associação do polimorfismo HPSE A/G com os parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos (variáveis categóricas)

Parâmetros	Valores referência	HPSE A/G						p*
		GG		AG		AA		
		n	%	n	%	n	%	
Sexo	Masculino	15	46,875	34	61,818	16	59,259	0,384
	Feminino	17	53,125	21	38,182	11	40,741	
	T	32	100	55	100	27	100	
IMC	<25	25	89,286	24	52,174	12	50,000	0,002
	≥25	3	10,714	22	47,826	12	50,000	
	T	28	100	46	100	24	100	
RNA	<400.000	9	28,125	19	35,185	5	18,519	0,295
	≥400.000	23	71,875	35	64,815	22	81,481	
	T	32	100	54	100	27	100	
Plaquetas	<150.000	8	25,00	10	18,182	10	37,037	0,176
	≥150.000	24	75,00	45	81,818	17	62,963	
	T	32	100	55	100	27	100	
ALP	≤105	31	96,875	51	94,444	24	88,889	0,432
	>105	1	3,125	3	5,556	3	11,111	
	T	32	100	54	100	27	100	
AST	≤34	25	78,125	42	76,364	17	62,963	0,345
	>34	7	21,875	13	23,636	10	37,037	
	T	32	100	55	100	27	100	
ALT	≤49	26	81,250	40	72,727	19	70,370	0,576
	>49	6	18,750	15	27,273	8	29,630	
	T	32	100	55	100	27	100	
GGT	≤38	15	46,875	13	23,636	7	25,926	0,063
	>38	17	53,125	42	76,364	20	74,074	
	T	32	100	55	100	27	100	

*Teste de independência do qui-quadrado de Pearson

Verificaram-se resultados estatisticamente significativos para o parâmetro do IMC.

- Genótipos AA e AG apresentam uma maior frequência relativa de indivíduos com IMC≥25kg/m². AA (50%), AG (47,83%), GG (10,71%).

Foi realizado o agrupamento dos genótipos segundo os modelos dominante e recessivo, sendo apenas apresentados os resultados estatisticamente significativos. (Tabela 9)

Tabela 9. Associação do polimorfismo HPSE A/G com os parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos (variáveis categóricas).

Parâmetros	Variáveis	HPSE A/G				p*	OR	[IC 95%]
		GG		AG/AA				
		n	%	n	%			
IMC	<25	25	89,286	36	51,429	<0,001	7,870	[2,175-28,478]
	≥25	3	10,714	34	48,571			
	T	28	100	70	100			
GGT	≤38	15	46,875	20	24,390	0,025	2,735	[1,160-6,451]
	>38	17	53,125	62	75,610			
	T	32	100	82	100			

* *Teste de Fisher*

- Indivíduos com os genótipos AG ou AA têm um risco 7,87 vezes maior de apresentar IMC ≥ 25 kg/m² comparativamente aos indivíduos homocigóticos para o alelo G.
- Indivíduos com os genótipos AG ou AA têm um risco 2,74 vezes maior de apresentar GGT >38 UI/L comparativamente aos indivíduos homocigóticos para o alelo G.

Tabela 10. Associação do polimorfismo HPSE A/G com os parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos (variáveis contínuas).

Parâmetros	Unidade de medida	HPSE A/G									p*
		GG			AG			AA			
		n	média	[IC 95%]	n	média	[IC 95%]	n	média	[IC 95%]	
Idade	anos	32	56,00	[51,73-60,27]	54	51,56	[48,24-54,87]	27	56,00	[51,89-60,11]	0,075
IMC	Kg/m ²	28	23,00	[22,06-23,94]	46	26,17	[24,94-27,40]	24	25,63	[23,74-27,51]	0,002
RNA	UI/ml	32	1,77E ⁺⁰⁶	[9,92E ⁺⁰⁵ -2,55E ⁺⁰⁶]	54	1,91E ⁺⁰⁶	[1,23E ⁺⁰⁶ -2,59E ⁺⁰⁶]	27	4,20E ⁺⁰⁶	[1,61E ⁺⁰⁶ -6,79E ⁺⁰⁶]	0,079
Plaquetas	U/microL	32	1,96E ⁺⁰⁵	[1,70E ⁺⁰⁵ -2,22E ⁺⁰⁵]	55	2,09E ⁺⁰⁵	[1,91E ⁺⁰⁵ -2,27E ⁺⁰⁵]	27	1,90E ⁺⁰⁵	[1,53E ⁺⁰⁵ -2,27E ⁺⁰⁵]	0,372
ALP	UI/L	32	79,59	[63,73-95,46]	54	78,06	[70,76-85,35]	27	85,00	[71,47-98,53]	0,618
AST	UI/L	32	52,81	[41,61-64,02]	55	54,18	[45,73-62,63]	27	68,00	[51,37-84,63]	0,278
ALT	UI/L	32	67,06	[44,81-89,32]	55	76,45	[62,93-89,98]	27	73,22	[57,82-88,62]	0,299
GGT	UI/L	32	59,81	[39,46-80,17]	55	95,25	[67,79-122,72]	27	98,04	[59,51-136,56]	0,054

* Teste Kruskal Wallis

Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas para o parâmetro IMC.

- Indivíduos com o genótipo AG e AA apresentam valores de IMC_{médio} mais elevados. AG (26,17kg/m²), AA(25,63kg/m²), GG (23kg/m²)

Foi realizado o agrupamento dos genótipos segundo os modelos dominante e recessivo, sendo apenas apresentados os resultados estatisticamente significativos. (Tabelas 11 e 12)

Tabela 11. Associação do polimorfismo HPSE A/G com os parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos (variáveis contínuas).

Parâmetros	Unidade de medida	HPSE A/G						p*
		GG/AG			AA			
		n	média	[IC 95%]	n	média	[IC 95%]	
RNA	UI/ml	86	1,86E ⁺⁰⁶	[1,35E ⁺⁰⁶ -2,37E ⁺⁰⁶]	27	4,20E ⁺⁰⁶	[1,61E ⁺⁰⁶ -6,79E ⁺⁰⁶]	0,025

* *Teste Mann-Whitney*

- Indivíduos com o genótipo AA apresentam uma carga viral média mais elevada (4,20E⁺⁰⁶ cópias) em comparação com os indivíduos GG/AG (1,86E⁺⁰⁶ cópias).

Tabela 12. Associação do polimorfismo HPSE A/G com os parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos (variáveis contínuas).

Parâmetros	Unidade de medida	HPSE A/G						p*
		GG			AG/AA			
		n	média	[IC 95%]	n	média	[IC 95%]	
IMC	Kg/m ²	28	23,00	[22,06-23,94]	70	25,99	[24,98-26,99]	0,001
GGT	UI/L	32	59,81	[39,46-80,17]	82	96,17	[74,28-118,06]	0,016

* *Teste Mann-Whitney*

- Indivíduos com os genótipos AG/AA apresentam um IMC_{médio} mais elevado (25,99 kg/m²) em comparação com os indivíduos GG (23 kg/m²).
- Indivíduos com os genótipos AG/AA apresentam níveis de GGT_{média} mais elevada (96,17 UI/L) em comparação com os indivíduos GG (59,81 UI/L).

Associação dos parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos com o estadio de fibrose para os genótipos do polimorfismo HPSE A/G

Tabela 13. Associação do estadio de fibrose com os parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos (variáveis categóricas) no genótipo GG do polimorfismo HPSE A/G.

Parâmetros	Valores referência	HPSE A/G (GG)				p*	OR	[IC 95%]
		F1/2		F3/4				
		n	%	n	%			
Sexo	Masculino	9	37,50	6	75,00	NA	—	—
	Feminino	15	62,50	2	25,00			
	T	24	100	8	100			
IMC	<25	18	85,714	7	100,00	NA	—	—
	≥25	3	14,286	0	0,00			
	T	21	100	7	100			
RNA	<400.000	7	29,167	2	25,00	NA	—	—
	≥400.000	17	70,833	6	75,00			
	T	24	100	8	100			
	<600.000	4	16,667	1	12,50	NA	—	—
	≥600.000	20	83,333	7	87,50			
T	24	100	8	100				
Plaquetas	<150.000	3	12,5	5	62,50	0,012	0,086	[0,013-0,558]
	≥150.000	21	87,5	3	37,50			
	T	24	100		100			
ALP	≤105	24	100	7	87,50	NA	—	—
	>105	0	0	1	12,50			
	T	24	100	8	100			
AST	≤34	21	87,50	4	50,00	0,047	7,000	[1,112-44,058]
	>34	3	12,50	4	50,00			
	T	24	100	8	100			
ALT	≤49	22	91,667	4	50,00	0,023	11,000	[1,483-81,606]
	>49	2	8,333	4	50,00			
	T	24	100	8	100			
GGT	≤38	13	54,167	2	25,00	NA	—	—
	>38	11	45,833	6	75,00			
	T	24	100	8	100			

* Teste de Fisher

Verificaram-se resultados estatisticamente significativos para os parâmetros: plaquetas, AST e ALT.

- Indivíduos com plaquetas <150.000 U/μL apresentam maior risco para os estadios de fibrose mais avançados (F3/4)
- Indivíduos com AST >34 UI/L têm um risco 7 vezes maior de apresentar um estadio de fibrose F3/4 comparativamente aos indivíduos com AST dentro do VR
- Indivíduos com ALT >49 UI/L têm um risco 11 vezes maior de apresentar um estadio de fibrose F3/4 comparativamente aos indivíduos com ALT dentro do VR

Tabela 14. Associação do estadio de fibrose com os parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos (variáveis categóricas) no genótipo AG do polimorfismo HPSE A/G.

Parâmetros	Valores referência	HPSE A/G (AG)				p*	OR	[IC 95%]	
		F1/2		F3/4					
		n	%	n	%				
Sexo	Masculino	20	57,143	14	70,00	NA	—	—	
	Feminino	15	42,857	6	30,00				
	T	35	100	20	100				
IMC	<25	14	50,00	10	55,56	NA	—	—	
	≥25	14	50,00	8	44,44				
	T	28	100	18	100				
RNA	<400.000	14	41,176	5	25,00	NA	—	—	
	≥400.000	20	58,824	15	75,00				
	T	34	100	20	100	NA	—	—	
	<600.000	12	35,294	5	25,00				
≥600.000	22	64,706	15	75,00	T	34	100	20	100
Plaquetas	<150.000	3	8,571	7	35,00	0,026	0,174	[0,039-0,779]	
	≥150.000	32	91,429	13	65,00				
	T	35	100	20	100				
ALP	≤105	34	97,143	17	89,47	NA	—	—	
	>105	1	2,857	2	10,53				
	T	35	100	19	100				
AST	≤34	33	94,286	9	45,00	<0,001	20,167	[3,769-107,909]	
	>34	2	5,714	11	55,00				
	T	35	100	20	100				
ALT	≤49	29	82,857	11	55,00	0,033	3,955	[1,139-13,727]	
	>49	6	17,143	9	45,00				
	T	35	100	20	100				
GGT	≤38	11	31,429	2	10,00	NA	—	—	
	>38	24	68,571	18	90,00				
	T	35	100	20	100				

*Teste de Fisher

Verificaram-se resultados estatisticamente significativos para os parâmetros: plaquetas, AST e ALT.

- Indivíduos com plaquetas <150.000 U/μL apresentam maior risco para estadio de fibrose mais avançados (F3/4)
- Indivíduos com AST >34 UI/L têm um risco 20,17 vezes maior de apresentar um estadio de fibrose F3/4 comparativamente aos indivíduos com AST dentro do VR
- Indivíduos com ALT >49 UI/L têm um risco 3,955 vezes maior de apresentar um estadio de fibrose F3/4 comparativamente aos indivíduos com ALT dentro do VR

Tabela 15. Associação do estadio de fibrose com os parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos (variáveis categóricas) no genótipo AA do polimorfismo HPSE A/G.

Parâmetros	Valores referência	HPSE A/G (AA)				p*	OR	[IC 95%]
		F1/2		F3/4				
		n	%	n	%			
Sexo	Masculino	9	69,231	7	50,00	NA	—	—
	Feminino	4	30,769	7	50,00			
	T	13	100	14	100			
IMC	<25	4	33,333	8	66,667	NA	—	—
	≥25	8	66,667	4	33,333			
	T	12	100	12	100			
RNA	<400.000	2	15,385	3	21,429	NA	—	—
	≥400.000	11	84,615	11	78,571			
	T	13	100	14	100			
	<600.000	2	15,385	3	21,429	NA	—	—
	≥600.000	11	84,615	11	78,571			
T	13	100	14	100				
Plaquetas	<150.000	3	23,077	7	50,00	NA	—	—
	≥150.000	10	76,923	7	50,00			
	T	13	100	14	100			
ALP	≤105	13	100,00	11	78,571	NA	—	—
	>105	0	0,00	3	21,429			
	T	13	100	14	100			
AST	≤34	11	84,615	6	42,857	0,046	7,333	[1,163-46,235]
	>34	2	15,385	8	57,143			
	T	13	100	14	100			
ALT	≤49	10	76,923	9	64,286	NA	—	—
	>49	3	23,077	5	35,714			
	T	13	100	14	100			
GGT	≤38	5	38,462	2	14,286	NA	—	—
	>38	8	61,538	12	85,714			
	T	13	100	14	100			

* Teste de Fisher

Verificaram-se resultados estatisticamente significativos para o parâmetro AST.

- Indivíduos com AST>34 UI/L têm um risco 7,33 vezes maior de apresentar um estadio de fibrose F3/4 comparativamente aos indivíduos com AST dentro do VR

Recorreu-se aos testes de Mann-Whitney para identificar possíveis associações entre os parâmetros antropométricos, sociodemográficos, metabólicos e bioquímicos e o estadió de fibrose para cada genótipo do polimorfismo HPSE A/G, e ao teste Kruskal Wallis para verificar a existência de associações entre os genótipos deste polimorfismo dentro do mesmo grupo de estadió de fibrose para cada parâmetro. (Tabela 16)

Tabela 16. Associação do estadió de fibrose com os parâmetros antropométricos, sociodemográficos, metabólicos e bioquímicos (variáveis contínuas) com o estadió de fibrose para cada um dos genótipos do polimorfismo HPSE A/G e associação entre genótipos dentro do mesmo grupo de estadió de fibrose para cada parâmetro.

Parâmetros	Fibrose	HPSE A/G												p**
		GG				AG				AA				
		n	média	[IC 95%]	p*	n	média	[IC 95%]	p*	n	média	[IC 95%]	p*	
Idade	F1/2	24	56,33	[51,49-61,17]	0,879	34	50,88	[46,28-55,48]	0,795	13	52,38	[47,68-57,09]	0,075	0,185
	F3/4	8	55,00	[43,51-66,49]		20	52,70	[47,85-57,55]		14	59,36	[52,65-66,06]		0,135
IMC	F1/2	21	23,05	[21,80-24,30]	0,893	28	25,50	[24,07-26,93]	0,366	12	26,42	[23,21-29,63]	0,620	0,028
	F3/4	7	22,86	[21,73-23,98]		18	27,22	[24,89-29,55]		12	24,83	[22,40-27,27]		0,029
RNA	F1/2	24	1,64E ⁺⁰⁶	[8,95E ⁺⁰⁵ -2,39E ⁺⁰⁶]	0,695	34	1,56E ⁺⁰⁶	[8,71E ⁺⁰⁵ -2,26E ⁺⁰⁶]	0,162	13	3,99E ⁺⁰⁶	[1,65E ⁺⁰⁶ -6,33E ⁺⁰⁶]	0,438	0,048
	F3/4	8	2,15E ⁺⁰⁶	[5,01E ⁺⁰⁵ -4,80E ⁺⁰⁶]		20	2,50E ⁺⁰⁶	[1,02E ⁺⁰⁶ -3,98E ⁺⁰⁶]		14	4,39E ⁺⁰⁶	[5,00E ⁺⁰⁵ -9,29E ⁺⁰⁶]		0,716
Plaquetas	F1/2	24	2,02E ⁺⁰⁵	[1,78E ⁺⁰⁵ -2,26E ⁺⁰⁵]	0,151	35	2,26E ⁺⁰⁵	[2,07E ⁺⁰⁵ -2,46E ⁺⁰⁵]	0,005	13	2,20E ⁺⁰⁵	[1,72E ⁺⁰⁵ -2,67E ⁺⁰⁵]	0,073	0,327
	F3/4	8	1,77E ⁺⁰⁵	[8,47E ⁺⁰⁴ -2,69E ⁺⁰⁵]		20	1,78E ⁺⁰⁵	[1,45E ⁺⁰⁵ -2,12E ⁺⁰⁵]		14	1,62E ⁺⁰⁵	[1,04E ⁺⁰⁵ -2,20E ⁺⁰⁵]		0,632
ALP	F1/2	24	73,58	[65,90-81,27]	0,711	35	74,14	[65,88-82,41]	0,117	13	67,23	[51,59-82,87]	0,006	0,319
	F3/4	8	97,63	[27,73-167,52]		19	85,26	[70,61-99,91]		14	101,50	[82,25-120,75]		0,124
AST	F1/2	24	43,21	[35,72-50,70]	0,029	35	40,80	[35,44-46,16]	<0,001	13	44,23	[31,44-57,02]	0,002	0,920
	F3/4	8	81,63	[44,46-118,79]		20	77,60	[59,88-95,32]		14	90,07	[64,04-116,10]		0,707
ALT	F1/2	24	48,83	[35,95-61,71]	0,005	35	61,31	[46,43-76,20]	0,001	13	64,08	[38,01-90,15]	0,072	0,496
	F3/4	8	121,75	[41,30-202,20]		20	102,95	[79,13-126,77]		14	81,71	[62,12-101,31]		0,361
GGT	F1/2	24	48,50	[29,55-67,45]	0,053	35	63,43	[47,55-79,31]	0,002	13	60,23	[29,54-90,92]	0,039	0,267
	F3/4	8	93,75	[30,36-157,14]		20	150,95	[84,13-217,77]		14	133,14	[65,24-201,05]		0,547

*Teste Mann-Whitney; **Teste Kruskal Wallis

Verificaram-se resultados estatisticamente significativos, por genótipo, na associação de diferentes parâmetros com o estadió de fibrose:

- Genótipo GG – valores médios de AST e ALT superiores nos estadios F3/4
- Genótipo AG – valores médios de plaquetas inferiores e de AST, ALT e GGT superiores nos estadios F3/4
- Genótipo AA – valores médios de ALP, AST e GGT superiores nos estadios F3/4

Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos para os parâmetros IMC (em ambos os grupos de estadios de fibrose) e carga viral (nos F1/2):

- F1/2 – IMC_{médio} mais elevado nos indivíduos AA (26,42 kg/m²), seguidos dos AG (25,5 kg/m²) e por fim os GG (23,05 kg/m²)
- F3/4 – IMC_{médio} mais elevado nos AG (27,22 kg/m²), seguidos dos AA (24,83 kg/m²) e por fim os GG (22,86 kg/m²)
- Indivíduos AA têm, em média, cargas virais significativamente maiores (3,99E⁺⁰⁶ cópias), seguidos dos GG (1,64E⁺⁰⁶) e por fim os AG (1,56E⁺⁰⁶)

Correlação entre os parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos

Tabela 17. Correlação de Pearson entre os parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos (variáveis contínuas).

		Plaquetas	ALP	AST	ALT	GGT
Idade	C. de Pearson	-0,151	0,227	0,136	-0,075	0,099
	ρ	0,009	0,000	0,015	0,186	0,079
	n	301	293	316	317	315
IMC	C. de Pearson	-0,109	0,121	0,051	0,139	0,220
	ρ	0,071	0,050	0,396	0,019	0,000
	n	275	263	284	285	284
RNA	C. de Pearson	-0,012	0,064	0,001	-0,062	0,194
	ρ	0,839	0,297	0,984	0,291	0,001
	n	277	271	290	290	288
Plaquetas	C. de Pearson		-0,101	-0,264	-0,197	-0,107
	ρ		0,092	0,000	0,001	0,066
	n		279	297	297	296
ALP	C. de Pearson			0,297	0,113	0,275
	ρ			0,000	0,053	0,000
	n			293	293	292
AST	C. de Pearson				0,816	0,420
	ρ				0,000	0,000
	n				317	315
ALT	C. de Pearson					0,320
	ρ					0,000
	n					316

Verificaram-se vários resultados estatisticamente significativos nas correlações entre os diferentes parâmetros.

As plaquetas estabelecem uma correlação inversa com a AST, ALT e a idade. A idade apresenta uma correlação direta com a ALP e AST que, por sua vez, apresentam também uma correlação direta entre si. A carga viral estabelece uma correlação direta com a GGT que, por sua vez, apresenta uma correlação direta com a ALP, AST, ALT e o IMC. Este último apresenta, também, uma correlação direta com a ALT.

Correlação entre os parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos por genótipo

Tabela 18. Correlação de Pearson entre os parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos (variáveis contínuas) no genótipo GG do polimorfismo HPSE A/G

HPSE A/G (GG)						
		Plaquetas	ALP	AST	ALT	GGT
Idade	C. de Pearson	0,055	-0,074	0,165	0,032	-0,136
	ρ	0,764	0,686	0,367	0,862	0,457
	n	32	32	32	32	32
IMC	C. de Pearson	0,028	0,018	0,113	0,227	0,169
	ρ	0,886	0,927	0,565	0,246	0,391
	n	28	28	28	28	28
RNA	C. de Pearson	-0,186	0,301	0,020	0,038	0,296
	ρ	0,307	0,094	0,915	0,837	0,100
	n	32	32	32	32	32
Plaquetas	C. de Pearson		0,166	-0,397	-0,387	-0,372
	ρ		0,363	0,025	0,029	0,036
	n		32	32	32	32
ALP	C. de Pearson			0,100	0,156	0,075
	ρ			0,586	0,394	0,685
	n			32	32	32
AST	C. de Pearson				0,767	0,281
	ρ				0,000	0,119
	n				32	32
ALT	C. de Pearson					0,399
	ρ					0,024
	n					32

Verificaram-se vários resultados estatisticamente significativos nas correlações entre os diferentes parâmetros dentro dos indivíduos com genótipo GG.

As plaquetas estabelecem uma correlação inversa com a AST, ALT e GGT. Esta última estabelece uma correlação direta com a ALT, que por sua vez, estabelece uma correlação direta com a AST.

Tabela 19. Correlação de Pearson entre os parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos (variáveis contínuas) no genótipo AG do polimorfismo HPSE A/G.

HPSE A/G (AG)						
		Plaquetas	ALP	AST	ALT	GGT
Idade	C. de Pearson	-0,095	0,293	0,195	0,019	0,160
	ρ	0,494	0,033	0,157	0,890	0,247
	n	54	53	54	54	54
IMC	C. de Pearson	-0,081	0,178	0,208	0,173	0,318
	ρ	0,593	0,241	0,166	0,250	0,031
	n	46	45	46	46	46
RNA	C. de Pearson	0,007	-0,212	0,064	0,139	0,287
	ρ	0,960	0,127	0,648	0,317	0,035
	n	54	53	54	54	54
Plaquetas	C. de Pearson		-0,039	-0,379	-0,331	-0,092
	ρ		0,778	0,004	0,013	0,504
	n		54	55	55	55
ALP	C. de Pearson			0,336	0,121	0,418
	ρ			0,013	0,382	0,002
	n			54	54	54
AST	C. de Pearson				0,834	0,528
	ρ				0,000	0,000
	n				55	55
ALT	C. de Pearson					0,398
	ρ					0,003
	n					55

Verificaram-se vários resultados estatisticamente significativos nas correlações entre os diferentes parâmetros dentro dos indivíduos com genótipo AG.

A idade apresenta uma correlação direta com a ALP que, por sua vez, apresenta uma correlação direta com a AST e GGT. Este último apresenta, também, uma correlação direta com a carga viral, IMC, ALP, AST e ALT. Estes dois últimos apresentam ainda uma correlação direta entre si. As plaquetas estabelecem uma correlação inversa com a AST e ALT.

Tabela 20. Correlação de Pearson entre os parâmetros sociodemográficos, antropométricos, virais, celulares, metabólicos e bioquímicos (variáveis contínuas) no genótipo AA do polimorfismo HPSE A/G

HPSE A/G (AA)						
		Plaquetas	ALP	AST	ALT	GGT
Idade	C. de Pearson	-0,235	0,096	-0,019	-0,170	-0,123
	ρ	0,237	0,632	0,924	0,396	0,540
	n	27	27	27	27	27
IMC	C. de Pearson	-0,045	-0,131	-0,058	-0,094	-0,079
	ρ	0,834	0,541	0,788	0,663	0,715
	n	24	24	24	24	24
RNA	C. de Pearson	0,511	-0,204	-0,390	-0,252	0,158
	ρ	0,006	0,307	0,044	0,205	0,430
	n	27	27	27	27	27
Plaquetas	C. de Pearson		-0,350	-0,574	-0,317	0,161
	ρ		0,073	0,002	0,107	0,423
	n		27	27	27	27
ALP	C. de Pearson			0,361	0,194	0,323
	ρ			0,064	0,333	0,100
	n			27	27	27
AST	C. de Pearson				0,852	0,362
	ρ				0,000	0,063
	n				27	27
ALT	C. de Pearson					0,325
	ρ					0,099
	n					27

Verificaram-se vários resultados estatisticamente significativos nas correlações entre os diferentes parâmetros dentro dos indivíduos com genótipo AA.

A AST estabelece uma correlação direta com a ALT e uma correlação inversa com a carga viral e as plaquetas. Estes dois últimos, por sua vez, estabelecem uma correlação direta entre si.

Resumo dos resultados

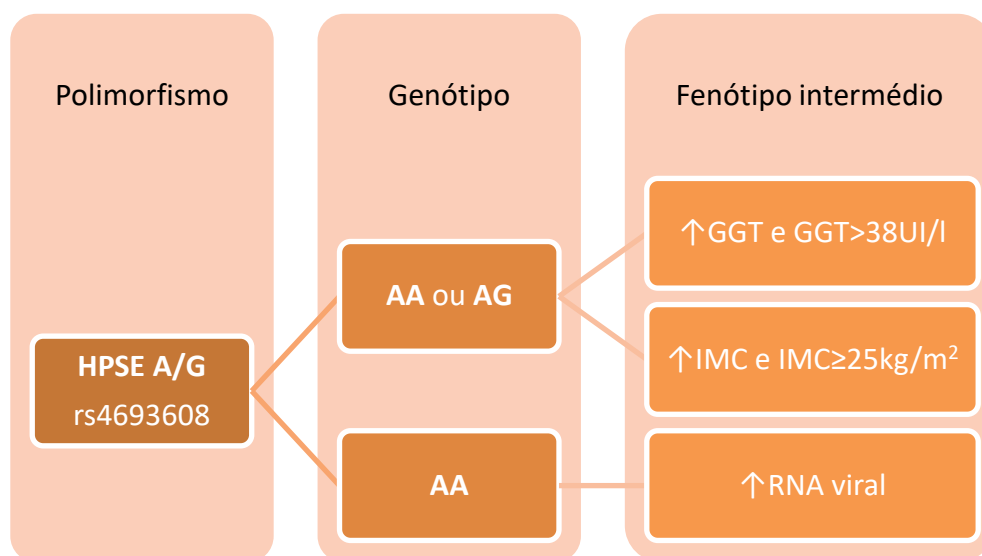


Figura 12. Associação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos, virais, celulares, metabólicos, bioquímicos e genéticos com o polimorfismo da HPSE rs4693608. (genótipo com fenótipo intermédio)

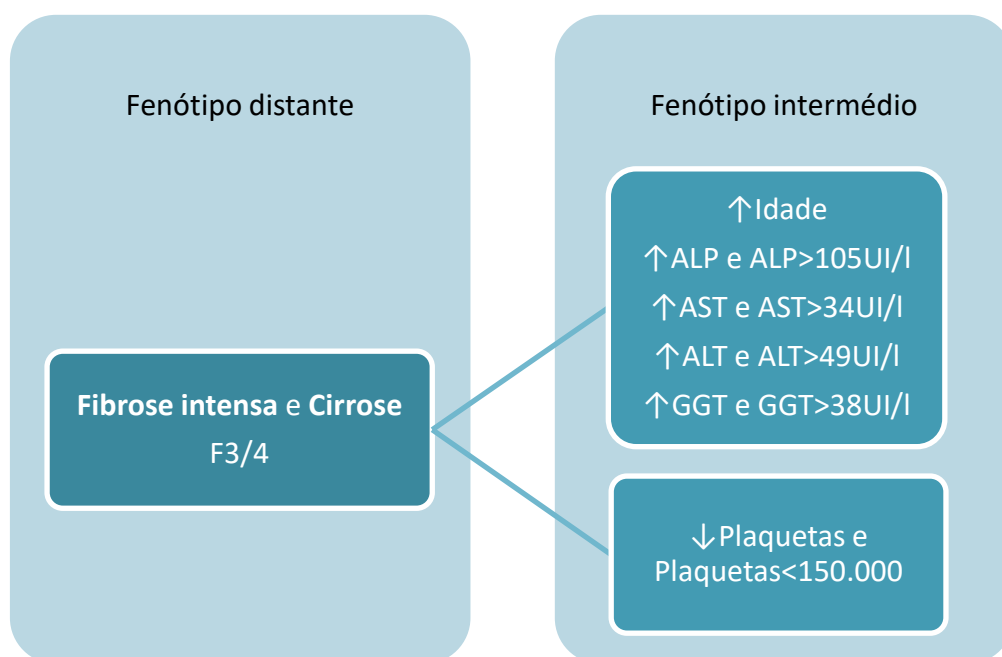


Figura 13. Associação dos parâmetros antropométricos, sociodemográficos, virais, celulares, metabólicos, bioquímicos e morfológicos com o estágio de fibrose. (fenótipo distante e fenótipo intermédio)

Discussão

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na frequência alélica, deste polimorfismo, entre a população com HCC e os grupos de controlo e europeu. E também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na associação entre os genótipos, deste polimorfismo, na população com HCC e o grupo de controlo.

De que haja conhecimento, este é o primeiro trabalho sobre a expressão do polimorfismo rs4693608 da HPSE na HCC e, como tal, tendo em conta os resultados aqui obtidos parece não haver uma associação entre este polimorfismo da HPSE com a suscetibilidade para o desenvolvimento de HCC.

Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas na associação dos estadios de fibrose mais avançados (F3/4) com idades mais avançadas, valores aumentados de ALP, AST, ALT e GGT, e número diminuído de plaquetas.

Genótipo GG

- Verificaram-se resultados estatisticamente significativos na associação com o estadio da fibrose nos parâmetros: plaquetas, AST e ALT.
- Apresentam valores médios superiores de AST e ALT nos estadios F3/4 comparativamente aos estadios mais leves.

Genótipo AG

- Verificaram-se resultados estatisticamente significativos na associação com o estadio da fibrose nos parâmetros: plaquetas, AST e ALT.
- Apresentam número médio de plaquetas inferior e de AST, ALT e GGT superiores nos estadios F3/4 comparativamente aos estadios mais leves de fibrose.

Genótipo AA

- Verificaram-se resultados estatisticamente significativos na associação com o estadio da fibrose no parâmetro AST
- Estes indivíduos apresentavam valores médios de ALP, AST e GGT superiores nos estadios F3/4 comparativamente aos estadios mais leves de fibrose.

Idade

Os indivíduos com uma idade mais elevada estão associados a estádios de fibrose mais avançados (F3/4), segundo o estudo realizado.

Esta afirmação está de acordo com o artigo de Lingala & Ghany, 2015, o estudo realizado por Minola et al., 2002, e o estudo realizado por Pradat et al., 2007.

Plaquetas

- Neste estudo verificou-se resultados estatisticamente significativos para indivíduos com estádios de fibrose mais avançados (F3/4) e baixos valores de plaquetas.
- Os indivíduos com plaquetas abaixo do VR (<150.000 U/ μ L) poderão estar associados a um desenvolvimento de fibrose em estádios mais avançados (F3/4) comparativamente aos indivíduos dentro do VR.
- Genótipo GG ou AG: Indivíduos com plaquetas <150.000 U/ μ L apresentam maior risco para os estádios de fibrose mais avançados (F3/4)

Estes resultados são corroborados por Murawaki Y., et al. Lima B., et al., Pereboom et al., Kurokawa & Ohkohchi e Ferreira et al., onde é demonstrado que baixos valores de plaquetas estão associados a estádios de fibrose mais elevados (*Pereboom et al., 2008; Kurokawa & Ohkohchi, 2017; Ferreira et al., 2023*).

Fosfatase Alcalina (ALP)

Está presente numa grande variedade de tecidos, sendo eles os ossos, os intestinos, o fígado, a placenta e os glóbulos brancos (*Kaplan, M.M., 1972*).

- Verificaram-se resultados estatisticamente significativos entre estádios de fibrose mais avançados (F3/4) e valores aumentados de ALP
- Os indivíduos com valores de ALP superiores ao VR (>105 UI/L) poderão estar associados ao desenvolvimento de fibrose em estádios mais avançados (F3/4),

apresentando um risco 6,64 vezes maior, comparativamente aos indivíduos dentro do VR.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com o estudo realizado por Shahid M., et al. onde se verifica que o aumento da ALP está associado a estadios mais graves de fibrose. No entanto, não existe ainda literatura que explique a influência dos níveis elevados de ALP nos estadios de fibrose hepática (*Shahid et al., 2014*).

Aspartato aminotransferase (AST)

- Foi verificada uma relação estatisticamente significativa entre estadios de fibrose mais avançados (F3/4) e valores elevados de AST.
- Os indivíduos com valores de AST superiores ao VR (>34 UI/L) poderão estar associados ao desenvolvimento de fibrose em estadios mais avançados (F3/4), apresentando um risco 6,14 vezes maior, comparativamente com os indivíduos cujos valores se encontram dentro do VR.
- Genotipo GG: Indivíduos com AST>34 UI/L têm um risco 7 vezes maior de apresentar um estadio de fibrose F3/4 comparativamente aos indivíduos com AST dentro do VR
- Genotipo AG: Indivíduos com AST>34 UI/L têm um risco 20,17 vezes maior de apresentar um estadio de fibrose F3/4 comparativamente aos indivíduos com AST dentro do VR
- Genotipo AA: Indivíduos com AST>34 UI/L têm um risco 7,33 vezes maior de apresentar um estadio de fibrose F3/4 comparativamente aos indivíduos com AST dentro do VR

Estes resultados vão ao encontro dos resultados do estudo por Shahid M., et al. onde se verificou que elevados níveis séricos de AST estão associados à lesão hepática (*Shahid et al., 2014*).

Alanina aminotransferase (ALT)

- Verificaram-se resultados estatisticamente significativos entre estadios de fibrose mais avançados (F3/4) e valores aumentados de ALT.
- Os indivíduos com valores de ALT superiores ao VR (>49 UI/L) poderão estar associados ao desenvolvimento de fibrose em estadios mais avançados (F3/4), apresentando um risco 2,59 vezes maior, comparativamente aos indivíduos dentro do VR (≤ 49 UI/L).
- Genótipo GG: Indivíduos com ALT>49 UI/L têm um risco 11 vezes maior de apresentar um estadio de fibrose F3/4 comparativamente aos indivíduos com ALT dentro do VR.
- Genótipo AG: Indivíduos com ALT>49 UI/L têm um risco 3,96 vezes maior de apresentar um estadio de fibrose F3/4 comparativamente aos indivíduos com ALT dentro do VR.

Estes resultados estão de acordo com o artigo de Lingala & Ghany, a pesquisa por Shahid M., et al. e também com o estudo de Fujiwara A., et al. ([Lingala & Ghany, 2015](#); [Shahid et al., 2014](#); [Fujiwara et al., 2008](#)).

IMC

- Indivíduos portadores do alelo A (AA e AG) apresentam valores de IMC e GGT mais elevados, comparativamente aos com genótipo GG.
- 50% dos indivíduos AA e 47,83% dos indivíduos AG apresentavam $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$, contrastando com apenas 10,71% dos indivíduos GG.
- O $IMC_{\text{médio}}$ dos indivíduos AA era de $25,63 \text{ kg/m}^2$, dos indivíduos AG $26,17 \text{ kg/m}^2$ e dos indivíduos GG 23 kg/m^2 .
- Indivíduos portadores do alelo A apresentam um $IMC_{\text{médio}}$ mais elevado ($25,99 \text{ kg/m}^2$) em comparação com os indivíduos GG (23 kg/m^2).

- Os indivíduos com genótipos AG/AA poderão estar associados ao excesso de peso/obesidade ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$), apresentando um risco 7,87 vezes maior para tal, comparativamente aos indivíduos com genótipo GG.

Verificaram-se também diferenças estatisticamente significativas no IMC, entre os genótipos e o estadio de fibrose:

- F1/2 – $IMC_{\text{médio}}$ mais elevado nos indivíduos AA (26,42 kg/m^2), seguidos dos AG (25,5 kg/m^2) e por fim os GG (23,05 kg/m^2)
- F3/4 – $IMC_{\text{médio}}$ mais elevado nos AG (27,22 kg/m^2), seguidos dos AA (24,83 kg/m^2) e por fim os GG (22,86 kg/m^2)

Como já referido os indivíduos portadores do alelo A apresentam uma menor expressão de HPSE plasmática quando em comparação com os de genótipo GG.

E, também, de acordo com o estudo Reyz et al. e Karlsson-Lindahl et al. que verificaram que a HPSE, através da quebra de cadeias de HS ligadas ao sindecano-3 e o sistema da melanocortina, funciona como um modulador negativo, tendo um efeito anorexigénio no sistema nervoso central, o que apoia os resultados obtidos neste trabalho, na medida em que se verificou uma associação entre os indivíduos com menor expressão de HPSE plasmática (portadores do alelo A) com IMCs mais elevados ([Reyz et al., 2006](#); [Karlsson-Lindahl et al., 2012](#)).

Gama-glutamil-transpeptidase (GGT)

- Foi verificada uma relação estatisticamente significativa entre elevados estadios de fibrose (F3/4) e valores elevados de GGT.
- Os indivíduos com valores de GGT superiores ao VR ($>38 \text{ UI/L}$) poderão estar associados ao desenvolvimento de fibrose em estadios mais avançados (F3/4), apresentando um risco 4,55 vezes maior, comparativamente aos indivíduos dentro do VR ($\leq 38 \text{ UI/L}$).
- Indivíduos portadores do alelo A (AA e AG) apresentam valores de IMC e GGT mais elevados, comparativamente aos com genótipo GG.

- Indivíduos AG/AA apresentam níveis de GGT_{média} mais elevados (96,17 UI/L) comparativamente aos indivíduos GG (59,81 UI/L).
- Os indivíduos portadores do alelo A poderão estar associados a valores de GGT superiores ao VR (>38UI/L), apresentando um risco 2,74 vezes maior, comparativamente aos indivíduos com genótipo GG.

Os resultados obtidos neste estudo são apoiados pelos estudos realizados por Lima et al.; Myers R.P., et al.; Eminler et al. e o estudo por Ferreira et al., que reportaram níveis de GGT mais elevados nos estadios de fibrose mais avançados, e o estudo por Everhart & Wright que demonstra uma associação entre fibrose grave, esteatose, insuficiência hepática, CHC e morte entre indivíduos com níveis mais elevados de GGT. Estando também os níveis plasmáticos mais baixos de HPSE nestes indivíduos (portadores do alelo A) a favorecer um maior aumento do IMC, síndrome metabólico e inflamação com maior lesão hepática e fibrose e como tal níveis superiores de GGT comparativamente a indivíduos GG. ([Lima et al., 2008](#); [Myers et al., 2003](#); [Eminler et al., 2014](#); [Ferreira et al., 2023](#); [Ferreira et al., 2022](#); [Everhart & Wright, 2013](#); [Latha & Ganesan, 2015](#)).

Carga viral

Verificaram-se resultados estatisticamente significativos entre indivíduos com o genótipo AA e cargas virais mais elevadas.

- Indivíduos com o genótipo AA apresentam uma carga viral média mais elevada ($4,20E^{+06}$ cópias) em comparação com os indivíduos GG/AG ($1,86E^{+06}$ cópias).

E, também, entre os genótipos e carga viral nos estadios de fibrose mais leves:

- Indivíduos AA têm, em média, cargas virais significativamente maiores ($3,99E^{+06}$ cópias), seguidos dos GG ($1,64E^{+06}$) e por fim os AG ($1,56E^{+06}$)
- Para os indivíduos com o genótipo AA verificou-se uma relação estatisticamente significativa com os elevados valores de RNA viral.

Sabe-se através do artigo de Thakkar N., et al. que o HCV vai usar o recetor de superfície celular da HPSE para entrar dentro da celular hospedeira ([Thakkar et al., 2017](#)). Como

referido anteriormente, sabe-se que o alelo A condiciona uma maior expressão de RNAm de HPSE mas uma menor expressão de HPSE sérica (*Ostrovsky et al., 2018*).

Colocando-se a hipótese para a existência de cargas virais mais elevadas nos indivíduos com o genótipo AA, estar relacionada com o facto de, por existir menos HPSE plasmática, haver uma menor competição entre esta e o vírus para a ligação ao recetor. Havendo, por isso, uma maior ligação do vírus ao recetor da HPSE e, conseqüentemente, uma maior entrada do mesmo nas células levando, assim, a um aumento da replicação viral.

Correlações entre os parâmetros estudados na população com HCC e nos diferentes genótipos do polimorfismo

As correlações na população estudada e também nos genótipos GG e AG foram ao encontro do esperado.

Verificaram-se correlações indiretas com as plaquetas e correlações diretas para marcadores de lesão hepática, marcadores associados à síndrome metabólica, a idade e carga viral. Como sabemos o HCV influencia o metabolismo lipídico, como tal, uma maior carga viral vai ter uma maior influencia no metabolismo dos lípidos que, por sua vez, favorece a síndrome metabólica, obesidade e esteatose que favorece a progressão da fibrose levando a uma maior lesão hepática e, como tal, a um menor número de plaquetas.

No genótipo AA destacamos a correlação direta encontrada entre a carga viral e o número de plaquetas. Este resultado pode encontrar explicação no facto da HPSE estar envolvida na produção de plaquetas para além de elas próprias exprimirem quantidades elevadas deste enzima (*Tan et al.,2018*).

Conclusão

O HS e a HPSE são conhecidos como sendo reguladores major da MEC, mas mais recentemente têm sido implicados como cruciais na patogénese dos mais diversos vírus.

O estudo da HPSE nas infeções víricas veio salientar que estas são processos multifatoriais e complexos que requerem que se tenha em consideração tanto os aspetos biológicos do agente patogénico invasor como também do hospedeiro, realçando a importância deste último em determinar o desfecho da infeção. É, então, esperado que a HPSE continue a surgir como um fator chave de virulência do hospedeiro que uma vez ativado potencia a disseminação viral e desencadeia as cascatas de inflamação.

Neste trabalho verificou-se uma associação fenótipo intermédio e fenótipo distante tendo sido identificados alguns parâmetros relacionados com a progressão dos estadios de fibrose: idade, plaquetas, ALP, AST, ALT e GGT. Sendo que a idade, ALP, AST, ALT e GGT se encontravam aumentados e as plaquetas diminuídas, nos estadios de fibrose mais elevados (F3/4). Estes resultados são os esperados pois aquando de infeção crónica por HCV é expectável que os parâmetros de lesão hepática estejam aumentados, e como tal, que exista uma diminuição das plaquetas pelo recrutamento ativo destas células para o fígado, pelo seu papel crucial na regeneração tecidular e, também, pelo sequestro esplénico resultante da hipertensão portal. Na associação genótipo e fenótipo intermédio, houve uma relação deste polimorfismo com maior carga viral, confirmando a importância da HPSE na replicação viral, e também com maiores níveis de IMC e GGT confirmando a sua grande influência na síndrome metabólica e balanço energético e indiretamente a sua influência no metabolismo dos lípidos.

Com isto podemos também concluir que os resultados obtidos neste estudo vão ter uma elevada relevância na aplicação clínica, pois através deles vai ser possível prever os riscos individuais da progressão da doença hepática e também individualizar o diagnóstico e assim aplicar-se o tratamento mais adequado para o quadro clínico do paciente.

Perspetivas futuras

Como ainda não é claro o mecanismo pelo qual a HPSE controla esta enorme variedade de processos biológicos, seria importante a realização de mais estudos. A investigação focada nos polimorfismos da HPSE permite-nos estudar os múltiplos e complexos níveis da regulação e funções da HPSE, obter mais pistas sobre os importantes ligantes da HPSE e a sua função na regulação génica, o papel desta nas infeções virais, a sua relação com os mecanismos de evasão da morte celular imunomediada pelas células cancerígenas e elucidar como a modificação na região do intensificador do gene da HPSE altera a sua expressão, podendo desta forma ajudar no desenvolvimento de novas e mais dirigidas terapias.

A identificação precoce e o tratamento adequado para a infeção podem mudar a progressão natural da doença. Como tal, a existência de mais estudos epidemiológicos em humanos e com amostras mais significativas, que examinem a associação entre os polimorfismos genéticos do gene da HPSE e a progressão nos estadios de fibrose em indivíduos com hepatite C crónica, é de elevada relevância, para que se consiga prever os riscos individuais da progressão da doença e, assim, ter um diagnóstico e tratamento mais adequado a cada indivíduo.

Seria então importante no futuro fazer o estudo sobre impacto deste polimorfismo no metabolismo dos lípidos e também na resposta às novas terapêuticas antivirais de ação direta na população com HCC, e também a influência da HPSE e deste polimorfismo nas infeções por outros vírus emergentes como, por exemplo, o HPV.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Prof^ª. Doutora Maria Clara Bicho por me ter orientado e por toda a disponibilidade, acessibilidade e entusiasmo durante todo este processo. À Dr^ª. Joana Ferreira por ter aceite ser coorientadora e ao Prof. Doutor Manuel Bicho um especial agradecimento pela disponibilidade e conjunta coorientação deste trabalho.

Também, um especial agradecimento, à Dr^ª. Mariana Oliveira (MSC), aos Professores Doutores Manuel Bicho, Deodália Dias e Fátima Serejo e Dr^ª. Joana Ferreira (BSC), pelos dados fornecidos que obtiveram no estudo *“Associação de polimorfismos genéticos de citocinas pró e anti-inflamatórias e dos seus níveis circulantes com a progressão da doença hepática na hepatite C crónica. 2020”*.

À minha grande amiga Rita Teixeira, M.Ed., pela revisão e correção do português deste trabalho e, por estar sempre presente, apesar da pouca compatibilidade de horários, com a sua boa disposição contagiante.

Um enorme obrigada à minha “segunda família”, de Lisboa, em especial à Liliana Marques, Vanessa Guedes, Elisa Medina, Madalena Mourato e Márcio Gonçalves, por todo o apoio, conselhos, ânimo, disponibilidade, paciência, compreensão, proatividade na resolução de problemas que foram surgindo pelo meu caminho, não esquecendo todas as alturas em que, sem hesitar, me acomodaram em suas casas. A toda a AcroTeam por serem uma fonte constante de satisfação e prazer, funcionando como um verdadeiro escape do dia-a-dia.

E claro, a toda a minha família, com destaque à minha irmã e pai, não há palavras para descrever o quanto vos estou grata por tudo que fizeram e fazem por mim. E, também, à minha mãe que sempre foi um potente motor na minha vida e percurso académico, sendo a minha frequência do MIM, um motivo de grande orgulho, da sua parte. Apesar de “nos ter deixado”, em 2015, por doença oncológica, e também por esse motivo, terá sido um grande incentivo para o regresso e finalização do MIM.

Gostaria também de agradecer à Maria Valente e família por toda a disponibilidade, amor, carinho, força e ajuda que me deram desde o primeiro dia que entrei nas vossas vidas.

Referências Bibliográficas

Agelidis, A., Shukla, D. (2020). Heparanase, Heparan Sulfate and Viral Infection. In: Vlodavsky, I., Sanderson, R., Ilan, N. (eds) Heparanase. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1221. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-34521-1_32

Amboss. (2023). General virology: Basics of virology. Retrieved: april, 2023, from https://www.amboss.com/us/knowledge/General_virology#anker=Z31d9600494d90f16a91063648ab3f4d3

Aroucha, D. C., Carmo, R. F., Vasconcelos, L. R., Lima, R. E., Mendonça, T. F., Arnez, L. E., Cavalcanti, M.doS., Muniz, M. T., Aroucha, M. L., Siqueira, E. R., Pereira, L. B., Moura, P., Pereira, L. M., & Coêlho, M. R. (2016). TNF- α and IL-10 polymorphisms increase the risk to hepatocellular carcinoma in HCV infected individuals. *Journal of medical virology*, 88(9), 1587–1595. <https://doi.org/10.1002/jmv.24501>

Bandiera, S., Billie Bian, C., Hoshida, Y., Baumert, T. F., & Zeisel, M. B. (2016). Chronic hepatitis C virus infection and pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Current opinion in virology*, 20, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.09.010>

Bréchet C. (1996). Hepatitis C virus: molecular biology and genetic variability. *Digestive diseases and sciences*, 41(12 Suppl), 6S–21S. <https://doi.org/10.1007/BF02087872>

Bressler, B. L., Guindi, M., Tomlinson, G., & Heathcote, J. (2003). High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 38(3), 639–644. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50350>

Butt, A. A., Umbleja, T., Andersen, J. W., Sherman, K. E., Chung, R. T., & ACTG A5178 Study Team (2012). Impact of peginterferon alpha and ribavirin treatment on lipid profiles and insulin resistance in Hepatitis C virus/HIV-coinfected persons: the AIDS Clinical Trials Group A5178 Study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 55(5), 631–638. <https://doi.org/10.1093/cid/cis463>

Chang, B. C., Hwang, L. C., & Huang, W. H. (2018). Positive Association of Metabolic Syndrome with a Single Nucleotide Polymorphism of Syndecan-3 (rs2282440) in the Taiwanese Population. *International journal of endocrinology*, 2018, 9282598. <https://doi.org/10.1155/2018/9282598>

Chedid, M. F., Krueel, C. R. P., Pinto, M. A., Grezzana-Filho, T. J. M., Leipnitz, I., Krueel, C. D. P., Scaffaro, L. A., & Chedid, A. D. (2017). HEPATOCELLULAR CARCINOMA: DIAGNOSIS AND OPERATIVE MANAGEMENT. *Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva: ABCD = Brazilian archives of digestive surgery*, 30(4), 272–278. <https://doi.org/10.1590/0102-6720201700040011>

Corchado, S., Márquez, M., Montes de Oca, M., Romero-Cores, P., Fernández-Gutiérrez, C., & Girón-González, J. A. (2013). Influence of Genetic Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 10 Genes on the Risk of Liver Cirrhosis in HIV-HCV Coinfected Patients. *PLoS one*, 8(6), e66619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066619>

Dai, C. Y., Yeh, M. L., Huang, C. F., Hou, C. H., Hsieh, M. Y., Huang, J. F., Lin, I. L., Lin, Z. Y., Chen, S. C., Wang, L. Y., Chuang, W. L., Yu, M. L., & Tung, H. D. (2015). Chronic hepatitis C infection is associated with insulin resistance and lipid profiles. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 30(5), 879–884. <https://doi.org/10.1111/jgh.12313>

Delgado-Borrego, A., Jordan, S. H., Negre, B., Healey, D., Lin, W., Kamegaya, Y., Christofi, M., Ludwig, D. A., Lok, A. S., Chung, R. T., & Halt-C Trial Group (2010). Reduction of insulin resistance with effective clearance of hepatitis C infection: results from the HALT-C trial. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 8(5), 458–462. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2010.01.022>

Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. (1994). Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. *Hepatology*, 19, 1513-1520. <http://doi.org/10.1002/hep.1840190629>

Dong, S., & Wu, X. Z. (2010). Heparanase and hepatocellular carcinoma: promoter or inhibitor?. *World journal of gastroenterology*, 16(3), 306–311. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i3.306>

Dubuisson, J., & Cosset, F. L. (2014). Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. *Journal of hepatology*, 61(1 Suppl), S3–S13. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.06.031>

Echeverría, N., Comas, V., Aldunate, F., Perbolianachis, P., Moreno, P., & Cristina, J. (2021). In the era of rapid mRNA-based vaccines: Why is there no effective hepatitis C virus vaccine yet?. *World journal of hepatology*, 13(10), 1234–1268. <https://doi.org/10.4254/wjh.v13.i10.1234>

Eminler, A. T., Irak, K., Ayyildiz, T., Keskin, M., Kiyici, M., Gurel, S., Gulden, M., Dolar, E., & Nak, S. G. (2014). The relation between liver histopathology and GGT levels in viral hepatitis: more important in hepatitis B. *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*, 25(4), 411–415. <https://doi.org/10.5152/tjg.2014.3693>

Esko, J. D., & Lindahl, U. (2001). Molecular diversity of heparan sulfate. *The Journal of clinical investigation*, 108(2), 169–173. <https://doi.org/10.1172/JCI13530>

Everhart, J. E., & Wright, E. C. (2013). Association of γ -glutamyl transferase (GGT) activity with treatment and clinical outcomes in chronic hepatitis C (HCV). *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 57(5), 1725–1733. <https://doi.org/10.1002/hep.26203>

Everhart, J. E., & Wright, E. C. (2013). Association of γ -glutamyl transferase (GGT) activity with treatment and clinical outcomes in chronic hepatitis C (HCV). *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 57(5), 1725–1733. <https://doi.org/10.1002/hep.26203>

Ferreira, J., Bicho, M., & Serejo, F. (2022). ABCA1 Polymorphism R1587K in Chronic Hepatitis C Is Gender-Specific and Modulates Liver Disease Severity through Its Influence on Cholesterol Metabolism and Liver Function: A Preliminary Study. *Genes*, 13(11), 2095. <https://doi.org/10.3390/genes13112095>

Ferreira, J., Oliveira, M., Bicho, M., & Serejo, F. (2023). Role of Inflammatory/Immune Response and Cytokine Polymorphisms in the Severity of Chronic Hepatitis C (CHC) before and after Direct Acting Antiviral (DAAs) Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1380. <https://doi.org/10.3390/ijms24021380>

Ferreira, V., & Pontarolo, R. (2017). Contextualização e Avanços no Tratamento da Hepatite C: Uma Revisão da Literatura. *Visão Acadêmica*, 18(1). <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v18i1.51007>

Fujiwara, A., Sakaguchi, K., Fujioka, S., Iwasaki, Y., Senoh, T., Nishimura, M., Terao, M., & Shiratori, Y. (2008). Fibrosis progression rates between chronic hepatitis B and C patients with elevated alanine aminotransferase levels. *Journal of gastroenterology*, 43(6), 484–491. <https://doi.org/10.1007/s00535-008-2183-8>

Guntipalli, P., Pakala, R., Kumari Gara, S., Ahmed, F., Bhatnagar, A., Endaya Coronel, M. K., Razzack, A. A., Solimando, A. G., Thompson, A., Andrews, K., Enebong Nya, G., Ahmad, S., Ranaldo, R., Cozzolongo, R., & Shahini, E. (2021). Worldwide prevalence, genotype distribution and management of hepatitis C. *Acta gastro-enterologica Belgica*, 84(4), 637–656. <https://doi.org/10.51821/84.4.015>

Hadigal, S. R., Agelidis, A. M., Karasneh, G. A., Antoine, T. E., Yakoub, A. M., Ramani, V. C., Djililian, A. R., Sanderson, R. D., & Shukla, D. (2015). Heparanase is a host enzyme required for herpes simplex virus-1 release from cells. *Nature communications*, 6, 6985. <https://doi.org/10.1038/ncomms7985>

Hepatitis C Online. (n.d.-a). Hepatitis C Virus Biology: Structure, Proteins, Life Cycle. *University of Washington Infectious Diseases Education & Assessment (IDEA) program*. Retrieved: June 2023, from <https://www.hepatitisc.uw.edu/page/hcv/biology>

Hepatitis C Online. (n.d.-b). Initial Evaluation of Chronic Hepatitis C Infection. *University of Washington Infectious Diseases Education & Assessment (IDEA) program*. Retrieved: June 2023, from www.hepatitisc.uw.edu/go/evaluation-staging-monitoring/initial-evaluation-chronic/core-concept/all

Hermano, E., Carlotti, F., Abecassis, A., Meirovitz, A., Rubinstein, A. M., Li, J. P., Vlodavsky, I., Rabelink, T. J., & Elkin, M. (2021). Dichotomic role of heparanase in a murine model of metabolic syndrome. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 78(6), 2771–2780. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03660-2>

Hopkins, J., Yadavalli, T., Agelidis, A. M., & Shukla, D. (2018). Host Enzymes Heparanase and Cathepsin L Promote Herpes Simplex Virus 2 Release from Cells. *Journal of virology*, 92(23), e01179-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01179-18>

Huynh, T., Zhang, J., & Hu, K. Q. (2018). Hepatitis C Virus Clearance by Direct-acting Antiviral Results in Rapid Resolution of Hepatocytic Injury as Indicated by Both Alanine Aminotransferase and Aspartate Aminotransferase Normalization. *Journal of clinical and translational hepatology*, 6(3), 258–263. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2018.00014>

- Karki, R., Pandya, D., Elston, R. C., & Ferlini, C. (2015). Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. *BMC medical genomics*, 8, 37. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0115-z>
- Karlsson-Lindahl, L., Schmidt, L., Haage, D., Hansson, C., Taube, M., Egecioglu, E., Tan, Y. X., Admyre, T., Jansson, J. O., Vlodavsky, I., Li, J. P., Lindahl, U., & Dickson, S. L. (2012). Heparanase affects food intake and regulates energy balance in mice. *PloS one*, 7(3), e34313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034313>
- Karlsson-Lindahl, L., Schmidt, L., Haage, D., Hansson, C., Taube, M., Egecioglu, E., Tan, Y. X., Admyre, T., Jansson, J. O., Vlodavsky, I., Li, J. P., Lindahl, U., & Dickson, S. L. (2012). Heparanase affects food intake and regulates energy balance in mice. *PloS one*, 7(3), e34313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034313>
- Kim, H. J., Park, J. H., Park, D. I., Cho, Y. K., Sohn, C. I., Jeon, W. K., & Kim, B. I. (2009). Clearance of HCV by Combination Therapy of Pegylated Interferon alpha-2a and Ribavirin Improves Insulin Resistance. *Gut and liver*, 3(2), 108–115. <https://doi.org/10.5009/gnl.2009.3.2.108>
- Kim, W. R., Flamm, S. L., Di Bisceglie, A. M., Bodenheimer, H. C., & Public Policy Committee of the American Association for the Study of Liver Disease (2008). Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 47(4), 1363–1370. <https://doi.org/10.1002/hep.22109>
- Koehler, M., Delguste, M., Sieben, C., Gillet, L., & Alsteens, D. (2020). Initial Step of Virus Entry: Virion Binding to Cell-Surface Glycans. *Annual review of virology*, 7(1), 143–165. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-122019-070025>
- Kurokawa, T., & Ohkohchi, N. (2017). Platelets in liver disease, cancer and regeneration. *World journal of gastroenterology*, 23(18), 3228–3239. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i18.3228>
- Lahiri, D. K., & Nurnberger, J. I., Jr (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic acids research*, 19(19), 5444. <https://doi.org/10.1093/nar/19.19.5444>
- Latha, P. J., & Ganesan, S. (2015). Correlation of Serum Gamma Glutamyl Transferase with Atherogenic Dyslipidemia in Obese Individuals. *Semantic Scholar J App Med Sci*, 3(1F), 387-91
- Lima, L. M. S. T. de B., Martins, J. R. M., Nader, H. B., Lacet, C. M. C., Balwani, M. D. C. L. V., & Pinhal, M. A. D. S. (2008). Valor preditivo de marcadores séricos de fibrose hepática em pacientes portadores de hepatite crônica viral C. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 44, 185–191. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442008000300005>
- Lindenbach, B. D., Thiel, H.-J., & Rice, C. M. (2007). Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Field's Virology*, 1101–1152.
- Lingala, S., & Ghany, M. G. (2015). Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterology clinics of North America*, 44(4), 717–734. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2015.07.003>

Lv, Q., Zeng, J., & He, L. (2016). The advancements of heparanase in fibrosis. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 7(4), 137–140.

Martelossi Cebinelli, G. C., Paiva Trugilo, K., Badaró Garcia, S., & Brajão de Oliveira, K. (2016). TGF- β 1 functional polymorphisms: a review. *European cytokine network*, 27(4), 81–89. <https://doi.org/10.1684/ecn.2016.0382>

Masola, V., Zaza, G., Arduini, A., Onisto, M., & Gambaro, G. (2021). Endothelial Glycocalyx as a Regulator of Fibrotic Processes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2996. <https://doi.org/10.3390/ijms22062996>

Meng, C., Li, N., Tong, Z., Yan, H., & Min, S. (2015). Reviews of Research on Risk Factors of Hepatitis C Virus Infection. *Infection International*, 4, 6–9. <https://doi.org/10.1515/ii-2017-0097>

Minola, E., Prati, D., Suter, F., Maggiolo, F., Caprioli, F., Sonzogni, A., et al. (2002). Age at infection affects the long-term outcome of transfusion-associated chronic hepatitis C. *Blood*, 99, 4588–4591. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0192>

Moradpour, D., Penin, F., & Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 453–463. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1645>

Myers, R. P., De Torres, M., Imbert-Bismut, F., Ratziu, V., Charlotte, F., & Poynard, T. (2003). Biochemical markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C: A comparison with prothrombin time, platelet count, and age-platelet index. *Digestive Diseases and Sciences*, 48, 146–153. <https://doi.org/10.1023/A:1021702902681>

Nadir, Y., & Brenner, B. (2014). Heparanase multiple effects in cancer. *Thrombosis research*, 133 Suppl 2, S90–S94. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(14\)50015-1](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(14)50015-1)

Naing, C., Mak, J. W., Ahmed, S. I., & Maung, M. (2012). Relationship between hepatitis C virus infection and type 2 diabetes mellitus: meta-analysis. *World journal of gastroenterology*, 18(14), 1642–1651. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i14.1642>

Ortiz, V., Berenguer, M., Rayón, J. M., Carrasco, D., & Berenguer, J. (2002). Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression. *The American journal of gastroenterology*, 97(9), 2408–2414.

Ostrovsky, O., Grushchenko Polaq, A. H., Beider, K., Mayorov, M., Canaani, J., Shimoni, A., Vlodaysky, I., & Nagler, A. (2018). Identification of strong intron enhancer in the heparanase gene: Effect of functional rs4693608 variant on HPSE enhancer activity in hematological and solid malignancies. *Oncogenesis*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0060-8>

Ostrovsky, O., Shimoni, A., Baryakh, P., Margulis, Y., Mayorov, M., Beider, K., Shteingauz, A., Ilan, N., Vlodaysky, I., & Nagler, A. (2014). Modification of heparanase gene expression in response to conditioning and LPS treatment: Strong correlation to rs4693608 SNP. *Journal of Leukocyte Biology*, 95, 677–688.

Ostrovsky, O., Shimoni, A., Rand, A., Vlodavsky, I., & Nagler, A. (2010). Genetic variations in the heparanase gene (HPSE) associate with increased risk of GVHD following allogeneic stem cell transplantation: Effect of discrepancy between recipients and donors. *Blood*, *115*, 2319–2328.

Ostrovsky, O., Vlodavsky, I., & Nagler, A. (2020). Mechanism of HPSE Gene SNPs Function: From Normal Processes to Inflammation, Cancerogenesis and Tumor Progression. *Advances in experimental medicine and biology*, *1221*, 231–249. https://doi.org/10.1007/978-3-030-34521-1_8

Palladino, C., Ezeonwumelu, I. J., Marcelino, R., Briz, V., Moranguinho, I., Serejo, F., et al. (2018). Epidemic history of hepatitis C virus genotypes and subtypes in Portugal. *Scientific Reports*, *8*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30528-0>

Pavlovic, N., Rani, B., Gerwins, P., & Heindryckx, F. (2019). Platelets as Key Factors in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, *11*(7), 1022. <https://doi.org/10.3390/cancers11071022>

Pereboom, I. T., Lisman, T., & Porte, R. J. (2008). Platelets in liver transplantation: friend or foe?. *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, *14*(7), 923–931. <https://doi.org/10.1002/lt.21510>

Petit, J. M., Bour, J. B., Galland-Jos, C., Minello, A., Verges, B., Guiguet, M., Brun, J. M., & Hillon, P. (2001). Risk factors for diabetes mellitus and early insulin resistance in chronic hepatitis C. *Journal of hepatology*, *35*(2), 279–283. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(01\)00143-x](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(01)00143-x)

Polaris Observatory HCV Collaborators. (2017). Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*, *2*(3), 161–176. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30181-9](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30181-9)

Pradat, P., Voirin, N., Tillmann, H. L., Chevallier, M., & Trépo, C. (2007). Progression to cirrhosis in hepatitis C patients: an age-dependent process. *Liver International*, *27*, 335–339. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2006.01430.x>

Reizes, O., Clegg, D. J., Strader, A. D., & Benoit, S. C. (2006). A role for syndecan-3 in the melanocortin regulation of energy balance. *Peptides*, *27*(2), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.02.030>

Romero-Gómez, M., Fernández-Rodríguez, C. M., Andrade, R. J., Diago, M., Alonso, S., Planas, R., Solá, R., Pons, J. A., Salmerón, J., Barcena, R., Perez, R., Carmona, I., & Durán, S. (2008). Effect of sustained virological response to treatment on the incidence of abnormal glucose values in chronic hepatitis C. *Journal of hepatology*, *48*(5), 721–727. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.11.022>

Ruhl, C. E., Menke, A., Cowie, C. C., & Everhart, J. E. (2014). Relationship of hepatitis C virus infection with diabetes in the U.S. population. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *60*(4), 1139–1149. <https://doi.org/10.1002/hep.27047>

Sabahi A. (2009). Hepatitis C Virus entry: the early steps in the viral replication cycle. *Virology journal*, 6, 117. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-117>

Saldarriaga, O. A., Dye, B., Pham, J., Wanninger, T. G., Millian, D., Kueht, M., Freiberg, B., Utay, N., & Stevenson, H. L. (2021). Comparison of liver biopsies before and after direct-acting antiviral therapy for hepatitis C and correlation with clinical outcome. *Scientific reports*, 11(1), 14506. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93881-7>

Sampaio, J., Ferreira, J., Santos, A.C., Bicho, M., & Bicho, M.C. (2021). The Importance of the Extracellular Matrix in HPV-Associated Diseases. *IntechOpen*. <http://doi.org/10.5772/intechopen.99907>

Sandrin, L., Fourquet, B., Hasquenoph, J. M., Yon, S., Fournier, C., Mal, F., Christidis, C., Ziol, M., Poulet, B., Kazemi, F., Beaugrand, M., & Palau, R. (2003). Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound in medicine & biology*, 29(12), 1705–1713. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2003.07.001>

Shahid, M., Idrees, M., Nasir, B., Raja, A. J., Raza, S. M., Amin, I., Rasul, A., & Tayyab, G. U. (2014). Correlation of biochemical markers and HCV RNA titers with fibrosis stages and grades in chronic HCV-3a patients. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 26(7), 788–794. <https://doi.org/10.1097/MEG.000000000000109>

Sharma, S. D. (2010). Hepatitis C virus: Molecular biology & current therapeutic options. *The Indian journal of medical research*, 131, 17–34.

Shastry B. S. (2009). SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 578, 3–22. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_1

Siagris, D., Christofidou, M., Theocharis, G. J., Pagoni, N., Papadimitriou, C., Lekkou, A., Thomopoulos, K., Starakis, I., Tsamandas, A. C., & Labropoulou-Karatza, C. (2006). Serum lipid pattern in chronic hepatitis C: histological and virological correlations. *Journal of viral hepatitis*, 13(1), 56–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2005.00655.x>

Simmonds, P., Becher, B., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D. B., Stapleton, J. T., & ICTV Report Consortium. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology*, 98(1), 2–3. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001057> (updated in 2019)

Suzuki, T., Ishii, K., Aizaki, H., & Wakita, T. (2007). Hepatitis C viral life cycle. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1200–1212. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.014>

Taherkhani, R., & Farshadpour, F. (2017). Global elimination of hepatitis C virus infection: Progresses and the remaining challenges. *World Journal of Hepatology*, 9, 1239–1252. <https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i33.1239>

Tan, Y. X., Cui, H., Wan, L. M., Gong, F., Zhang, X., Vlodavsky, I., & Li, J. P. (2018). Overexpression of heparanase in mice promoted megakaryopoiesis. *Glycobiology*, 28(5), 269–275. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy011>

U.S.V.A. Health Department. (2018). Viral Hepatitis and Liver Disease: Natural History of Hepatitis C. *U.S. Veterans Affairs*. Retrieved: june, 2023, from, <https://www.hepatitis.va.gov/hcv/index.asp>

Vlodavsky, I., Sanderson, R. D., & Ilan, N. (Eds.). (2020). *Heparanase: From Basic Research to Clinical Applications* (1st ed.). *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1221, pp. XVIII, 885). *Springer Cham*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-34521-1>

Walter, S.R., Thein, H.-H., Gidding, H.F., Amin, J., Law, M.G., George, J. and Dore, G.J. (2011). Risk factors for hepatocellular carcinoma in a cohort infected with hepatitis B or C. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26, 1757-1764. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.06785.x>

White, D. L., Ratziu, V., & El-Serag, H. B. (2008). Hepatitis C infection and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Journal of hepatology*, 49(5), 831–844. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.08.006>

WHO. (n.d.). *Hepatitis C*. WHO Fact Sheet Retrieved: June, 2023, from <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> (Last updated: June 24, 2022)

Wuytack, F., Lutje, V., Jakobsen, J. C., Weiss, K. H., Flanagan, P., Gethin, G., Murphy, L., Smyth, S., Devane, D., & Smith, V. (2018). Sexual transmission of Hepatitis C Virus infection in a heterosexual population: A systematic review. *HRB open research*, 1, 10. <https://doi.org/10.12688/hrbopenres.12791.1>

Zechini, B., Pasquazzi, C., & Aceti, A. (2004). Correlation of serum aminotransferases with HCV RNA levels and histological findings in patients with chronic hepatitis C: the role of serum aspartate transaminase in the evaluation of disease progression. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 16(9), 891–896. <https://doi.org/10.1097/00042737-200409000-00013>

Zhu, W., Li, J., & Liang, G. (2011). How does cellular heparan sulfate function in viral pathogenicity?. *Biomedical and environmental sciences: BES*, 24(1), 81–87. <https://doi.org/10.3967/0895-3988.2011.01.011>