

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS EM
GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA

**Papel dos níveis séricos de vitamina D e das
variantes genéticas envolvidas na sua rota
metabólica na hepatite C crônica.**

LAURA ALENCASTRO DE AZEVEDO

Tese de Doutorado

PORTO ALEGRE, BRASIL
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS EM
GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA

**Papel dos níveis séricos de vitamina D e das
variantes genéticas envolvidas na sua rota
metabólica na hepatite C crônica.**

LAURA ALENCASTRO DE AZEVEDO

Orientador: Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

PORTO ALEGRE, BRASIL
2017

CIP - Catalogação na Publicação

Azevedo, Laura Alencastro de

Papel dos níveis séricos de vitamina D e das variantes genéticas envolvidas na sua rota metabólica na hepatite C crônica. / Laura Alencastro de Azevedo.

-- 2017.

118 f.

Orientador: Mário Reis Álvares-da-Silva.

Coorientadora: Themis Reverbél da Silveira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Hepatite C. 2. Vitamina D. 3. Polimorfismos.
I. Álvares-da-Silva, Mário Reis, orient. II.
Silveira, Themis Reverbél da, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva, que me proporcionou uma enorme oportunidade de aprendizado. Sempre disposto a dividir todo seu conhecimento na simplicidade de uma caneta e um pedaço de papel. Muito obrigada pelo voto de confiança e acolhida, levarei esta experiência comigo.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira, que me incentivou e apoiou desde o início da minha entrada na pós-graduação. Fazer parte do seu grupo de pesquisa e desta família “Hepatológica” é uma honra. Não tenho dúvidas de que muito do que sou hoje, profissional e pessoalmente, deve-se ao que aprendi com a senhora.

À Profa. Dra. Ursula Matte, coorientadora informal, mas essencial. Sempre disponível, crítica e sincera, com sugestões brilhantes e salvadoras. Obrigada por tudo que fizeste por mim e pelos anos de convívio e amizade.

À estudante de Farmácia Jacqueline Weis Bonfanti, bolsista exemplar, que participou e auxiliou em todas as horas de ambulatório e bancada. Teu comprometimento e dedicação apenas comprovam a excelente profissional que já és.

Às colegas e parceiras de ambulatório e coleta de dados, Juliana Bruch e Aline Brietzke, com quem tive uma maravilhosa convivência e experiência.

Aos meus queridos colegas do Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental (Ana Cláudia, Carolina, Dr. Jorge, Giovana, Inês, Larisse, Leila, Thais, Raquel, Renata e todos aqueles que já foram ou chegaram), pelas trocas e amizade durante todo este tempo.

Aos médicos do ambulatório de Hepatites Virais, Matheus Michalczuck, Alexandre de Araújo e Antônio de Barros Lopes, que sempre doaram seu tempo ajudando na captação dos pacientes.

Às Profas. Dras. Mara Hutz e Sidia Maria Callegari Jacques, pelas sugestões críticas nas análises dos dados.

Às bioinformatas Mariana Mendoza e Delva Leão, que compartilharam um pouco do seu conhecimento, me ajudando em etapas críticas do trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, duas instituições de excelência que promoveram minha formação acadêmica e seguem oferecendo novas oportunidades.

Aos meus pais, pois sem eles nada disso faria sentido ou seria possível.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	Hepatite C	11
2.1.1	Fibrose hepática	12
2.1.2	Evolução da hepatite C	17
2.1.3	Tratamento	19
2.2	Vitamina D	21
2.2.1	Metabolismo da vitamina D	22
2.2.2	Recomendações de diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D	24
2.2.3	Vitamina D e doenças hepáticas	26
2.3	Imputação Genômica	32
2.4	HALT-C (<i>Hepatitis C Antiviral Long-term Treatment against Cirrhosis</i>)	34
3	JUSTIFICATIVA	37
4	QUESTÃO DE PESQUISA	38
5	HIPÓTESE	39
6	OBJETIVOS	40
6.1	Objetivo Geral	40
6.2	Objetivos Específicos	40
7	ARTIGOS	42
7.1	Artigo 1	42
7.2	Artigo 2	42
8	CAPÍTULO 1	43
9	CAPÍTULO 2	60
10	CONCLUSÕES	85
11	PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS	87

12	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	89
13	ANEXOS	99
13.1	Anexo I - Variáveis disponíveis do estudo HALT-C na plataforma dbGaP	99
13.2	Anexo II - Desfechos utilizados no artigo 2	103
13.3	Anexo III – Carta de aceite do Artigo 1	105
13.4	Anexo IV – Submissão Artigo 2	106
14	APÊNDICES	107
14.1	Apêndice I - Passo-a-passo das análises genóticas	107

RESUMO

Introdução: Nos últimos anos têm-se demonstrado que a vitamina D desempenha um papel crucial em muitas doenças agudas e crônicas, não só afetando as condições ósseas, mas também aumentando o risco de fraturas, doenças auto-imunes e câncer. A influência da vitamina D nas doenças do fígado tem sido amplamente discutida já que esta sofre metabolismo hepático. Indivíduos com doenças hepáticas, e em especial com hepatite C crônica, apresentam maior prevalência de deficiência de vitamina D. **Objetivos:** Avaliar, em duas amostras distintas, a influência dos níveis séricos de vitamina D e/ou dos polimorfismos envolvidos na sua rota metabólica na progressão da doença hepática crônica causada pelo vírus C. **Métodos:** A primeira amostra consistiu de um estudo transversal com 132 pacientes com hepatite C crônica genótipo 1 do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Foi avaliada a influência de níveis séricos de vitamina D e dos polimorfismos rs7041 e rs4588 do gene *GC* no grau de fibrose hepática (escore METAVIR). As genotipagens foram feitas com ensaio TaqMan e as análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS v.20.0. A segunda amostra consistiu da análise de dados extraídos da plataforma dbGaP. Foram investigados 681 pacientes com hepatite C crônica da coorte americana HALT-C, acompanhados pelo período quatro anos. Avaliou-se a relação de 40 polimorfismos dos genes *DHCR7*, *GC*, *CYP2R1*, *CYP24A1*, *CYP27B1*, *VDR*, *SMAD3* e *TGFBI* nos seguintes desfechos: piora da fibrose hepática; descompensação hepática (escore Child Pugh-Turcotte >7, ascite, encefalopatia hepática, peritonite bacteriana espontânea e/ou sangramento de varizes gastroesofágicas); desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e morte do fígado. Os polimorfismos que não se encontravam disponíveis no banco de dados foram imputados com o programa Mach-Admix 2.0.203 e as análises foram no programa Plink 1.07 e foi realizada correção de Bonferroni. Nesta amostra, resultados com $P < 0,05$ foram considerados

como tendência à associação. **Resultados:** Na amostra do HCPA, níveis diminuídos de vitamina D, bem como a deficiência grave de vitamina D, foram mais frequentes entre pacientes com fibrose intermediária/avançada (METAVIR 3 e 4). Embora os polimorfismos rs7041 e rs4588 e seus haplótipos tenham apresentado relação com os níveis séricos de vitamina D, estes não apresentaram associação com a gravidade da fibrose hepática. Na segunda amostra estudada, onze polimorfismos tiveram tendência à associação ($P < 0,05$) com os desfechos analisados: quatro SNPs no gene *DHCR7* com descompensação hepática (rs4944957, rs12800438, rs3829251 e rs4945008); dois no gene *GC* com piora da fibrose e morte do fígado (rs7041 e rs222020); dois no gene *CYP2R1* com ascite ou carcinoma hepatocelular (rs7116978 e rs1562902); dois no gene *VDR* com sangramento de varizes gástricas e carcinoma hepatocelular (rs4516035 e rs2239186); e um no gene *SMAD3* com piora da fibrose e encefalopatia (rs2118610). Apenas um polimorfismo, rs1800469 no gene *TGFBI*, apresentou associação com descompensação hepática após correção de Bonferroni ($P < 0,05/40$). **Conclusões:** Nossos resultados demonstraram que níveis séricos menores de vitamina D estão associados à progressão da fibrose hepática na hepatite C crônica genótipo 1. Além disso, os onze polimorfismos da rota da vitamina D que apresentaram tendência à associação estatística, indicam que variantes genéticas da rota metabólica da vitamina D possuem fraca ou nenhuma relação com a progressão da hepatite C crônica, merecendo análises futuras. Já o polimorfismo rs1800469, do gene *TGFBI*, demonstrou potencial utilidade para auxiliar na identificação de pacientes com maior chance de descompensação hepática.

ABSTRACT

Introduction: In the past years it has been demonstrated that vitamin D plays a crucial role in many acute and chronic diseases, not only affecting bone conditions but increasing the chance of fractures, autoimmune diseases and cancer. Vitamin D influence in liver disease is also widely discussed since it undergoes through hepatic metabolism. Subjects with liver diseases, especially chronic hepatitis C, present higher rates of vitamin D deficiency. **Objectives:** Evaluate, in two different samples, the influence of vitamin D serum levels and/or polymorphisms of vitamin D metabolic pathway in liver disease progression in patients with chronic hepatitis C. **Methods:** The first sample consisted of a transversal study with 132 patients from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) with chronic hepatitis C genotype 1. We evaluated the influence of serum levels of vitamin D and rs7041 and rs4588 *GC* polymorphisms over liver fibrosis (METAVIR scoring). Genotyping was performed with TaqMan probes and statistical analyses were conducted using SPSS v.20.0. The second sample was extracted from HALT-C cohort available in dbGap platform. It included 681 patients with chronic hepatitis C, followed for 4 years. Forty polymorphisms in *DHCR7*, *GC*, *CYP2R1*, *CYP24A1*, *CYP27B1*, *VDR*, *SMAD3* and *TGFB1* genes were analyzed with the following outcomes: worsening of fibrosis; hepatic decompensation (gastric/esophageal bleeding, CTP > 7, ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and/or encephalopathy); development of hepatocellular carcinoma; and liver death. Polymorphisms not available in dbGaP data were imputed using Mach-Admix 2.0.203 software and analyses were performed in Plink v.1.07 and a Bonferroni's correction was performed. Results with $P < 0.05$ were considered as having tendency towards association. **Results:** In HCPA sample low serum vitamin D, as well as severe vitamin D deficiency, were more frequent among patients with intermediate/severe fibrosis (METAVIR 3 and 4). Although rs7041 and rs4588

polymorphisms and its haplotypes presented association with serum levels of vitamin D, they were not associated with severity of liver fibrosis. In sample two, eleven polymorphisms presented tendency towards association ($P < 0.05$) with the studied outcomes: four SNPs in *DHCR7* with hepatic decompensation (rs4944957, rs12800438, rs3829251 and rs4945008); two in *GC* with worsening of fibrosis and liver death (rs7041 and rs222020); two in *CYP2R1* with ascites or hepatocellular carcinoma (rs7116978 and rs1562902); two in *VDR* with gastric/esophageal bleeding and hepatocellular carcinoma (rs4516035 and rs2239186); and one in *SMAD3* with worsening of fibrosis and encephalopathy (rs2118610). Only one polymorphism, rs1800469 in *TGFBI*, showed statistical significance with hepatic decompensation after Bonferroni's correction ($P < 0.05/40$). **Conclusions:** Our results demonstrated that low serum vitamin D has association with fibrosis progression in chronic hepatitis C genotype 1. Also, the eleven polymorphisms with tendency towards association indicate that genetic variants in vitamin D pathway possess weak or none relation with progression of chronic hepatitis C, deserving future analyses. Finally, polymorphism rs1800469 in *TGFBI* demonstrated potential utility to help identify patients with higher odds of hepatic decompensation.

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH)D	1,25-hidróxi vitamina D
25(OH)D	25-hidróxi vitamina D
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
CEH	célula estrelada hepática
CHC	carcinoma hepatocelular
CPT	Child-Pugh-Turcotte
CTGF	fator de crescimento do tecido conetivo
CYP450	enzimas do citocromo P450
dbGaP	<i>database of Genotypes and Phenotypes</i>
DBP	proteína ligadora da vitamina D
EPIC	<i>European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition</i>
GC	gene da GC-globulina
GWAS	<i>Genomw Wide Association Study</i>
HALT-C	<i>The Hepatitis C Antiviral Long-term Treatment against Cirrhosis</i>
HCC	Hepatite C crônica
INF-PEG	interferon peguilado
MEC	matriz extracelular
MELD	<i>Model for End-Stage Liver Disease</i>
MMP	metaloproteinase de matriz
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
PBE	peritonite bacteriana espontânea
PDGF	fator de crescimento plaquetário

RBV	ribavirina
RVS	resposta virológica sustentada
RXR	receptor retinoide
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TGFβ	fator de crescimento transformador beta
TIMP	inibidores de metaloproteinase
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
VDR	receptor de vitamina D
VDRE	elementos responsivos à vitamina D
α-SMA	alfa actina específica da musculatura lisa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução da infecção pelo vírus C.....	12
Figura 2. Morfologia das células estreladas hepáticas no fígado normal.....	13
Figura 3. Mecanismos de fibrose hepática.	15
Figura 4. Taxas de resposta virológica sustentada em pacientes virgens de tratamento com hepatite C genótipo 1 e 4 em diversos regimes terapêuticos.....	20
Figura 5. Metabolismo da vitamina D.	23
Figura 6. Modelo proposto da interação genômica VDR/SMAD no controle da resposta de genes pró-fibrogênese em células estreladas hepáticas.	29
Figura 7. Imputação genômica de uma amostra de indivíduos não relacionados.	33
Figura 8. Desenho do estudo HALT-C.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cálculo do escore Child-Pugh-Turcotte.	19
Tabela 2. Fontes alimentares de vitamina D.	24
Tabela 3. Doses diárias recomendadas para população em geral e populações de risco.	26
Tabela 4. Polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo da vitamina D e da interação TGF β 1/SMAD3/VDR que tenham relação com níveis séricos de vitamina D e processos relacionados a evolução da doença hepática.	31

1 INTRODUÇÃO

A hepatite C crônica (HCC) se caracteriza pela viremia persistente após seis meses de infecção (1), o que ocorre em 55 a 85% dos casos de infecção aguda (2). A infecção crônica costuma evoluir com fibrose hepática, sendo que 20-30% dos indivíduos progridem para cirrose após 25-30 anos de infecção e destes, 1 a 4% evoluem a carcinoma hepatocelular (CHC) (2). A cirrose é caracterizada por uma fase assintomática chamada de “cirrose compensada” e é seguida de uma rápida fase progressiva marcada pelo desenvolvimento de complicações de hipertensão portal e/ou disfunção hepática, denominada “cirrose descompensada” (3). A HCC é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de CHC (4). Globalmente, a porcentagem de doentes com cirrose ou CHC que é atribuível a infecção pelo HCV foi estimada em 27% e 25%, respectivamente, resultando em um total de 211.000 mortes por cirrose e 155.000 mortes por CHC em 2002 (5).

A vitamina D é uma molécula lipofílica complexa, cuja fórmula elementar é $C_{27}H_{44}O$ e refere-se a um grupo de compostos esteroides chamados vitamina D3 (colecalfiferol) e vitamina D2 (ergocalciferol) (6). A vitamina D é um hormônio essencial para o crescimento e desenvolvimento normais, com efeitos bem documentados em ossos, músculos e homeostase mineral. O metabólito 25(OH)D é utilizado para determinar o status de vitamina D. É recomendado que os níveis séricos de 25(OH)D estejam acima de 30 ng/mL (suficiência). Níveis séricos entre 20 a 29 são considerados insuficiência, enquanto abaixo de 20ng/mL, deficiência (7). Polimorfismos nos genes envolvidos na síntese, transporte e metabolização da vitamina D sabidamente afetam seus níveis circulantes, principalmente nos *loci* que codificam os genes *GC*, *DHCR7* e *CYP2R1* (8-10).

Nos últimos anos, a influência da vitamina D nas doenças do fígado tem sido amplamente discutida por esta ser uma população de risco para hipovitaminose D já que este hormônio sofre metabolismo hepático. A deficiência de vitamina D já foi associada a maior progressão da fibrose hepática (11), descompensação da cirrose (12), maior incidência de carcinoma hepatocelular (13) e piores taxas de resposta à terapia antiviral (14).

Recentemente foi proposto que a vitamina D diminui a fibrose hepática por limitar a ativação das CEHs, através de um efeito mediado pela interação VDR/SMAD3 (15). O VDR, receptor nuclear da vitamina D, co-ocupa 10.436 sítios genômicos que são ativados pelo SMAD3, efetor da cascata do TGF β 1, importante quimiocina fibrogênica. O VDR após a ligação de seu agonista compete pelos mesmos locais que o SMAD3, inibindo a transcrição de genes pró-fibrogênese que são ativados pelo TGF β /SMAD.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hepatite C

Na década de 70 a literatura descreveu os primeiros casos de hepatite viral causada por um agente diverso dos já conhecidos vírus da hepatite A e B.(16). Em 1989 foi identificado e isolado pela primeira vez por técnicas moleculares o vírus da hepatite C, responsável pelos casos da então chamada hepatite não-A, não-B (17).

Estima-se que 100 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo vírus C (18), e que em 2014 existiam 1.450.000 portadores no Brasil (19). A via de transmissão do vírus é parenteral- pelo uso de drogas ilícitas, transfusão sanguínea e transplante de órgãos (1). Procedimentos de manicure, realização de tatuagens, colocação de *piercings*, tratamentos odontológicos, uso de seringas de vidro, endoscopia digestiva alta e relações sexuais desprotegidas também configuram fatores de risco para transmissão do vírus (20). No Brasil, a hepatite C acomete com maior frequência a faixa etária dos indivíduos com mais de 40 anos, já que somente a partir de 1993 a tecnologia necessária para identificação do vírus C chegou aos bancos de sangue (20).

A hepatite C é causada por um RNA vírus da família *Flaviviridae* (1) e existem sete genótipos já descritos (21). Os genótipos 1, 2 e 3 têm distribuição mundial; dentre eles, os subtipos 1a e 1b são os mais comuns, representando 60% das infecções no mundo (19). No Brasil, Campiotto e colaboradores estudaram a distribuição dos genótipos em diferentes cidades e mostraram que aproximadamente 65% dos portadores crônicos do vírus C eram do genótipo 1; 30% do genótipo 3; e menos de 5% apresentavam os genótipos 2, 4 e 5 (22). No entanto, diferentemente dos outros estados, no Rio Grande do Sul, o genótipo 3 foi o mais frequente (62,5%) entre os indivíduos estudados (22).

O curso da doença é em geral silencioso. As infecções agudas são normalmente assintomáticas e a resolução espontânea ocorre em 15 a 45% dos casos (2). A hepatite C crônica (HCC) se caracteriza pela viremia persistente após seis meses de infecção (1), o que acomete de 55 a 85% dos casos (Figura 1) (2). A infecção crônica evolui com fibrose hepática, onde 20-30% dos indivíduos progridem para cirrose após 25-30 anos de infecção e destes, até 4% evoluem a carcinoma hepatocelular (CHC) (2).

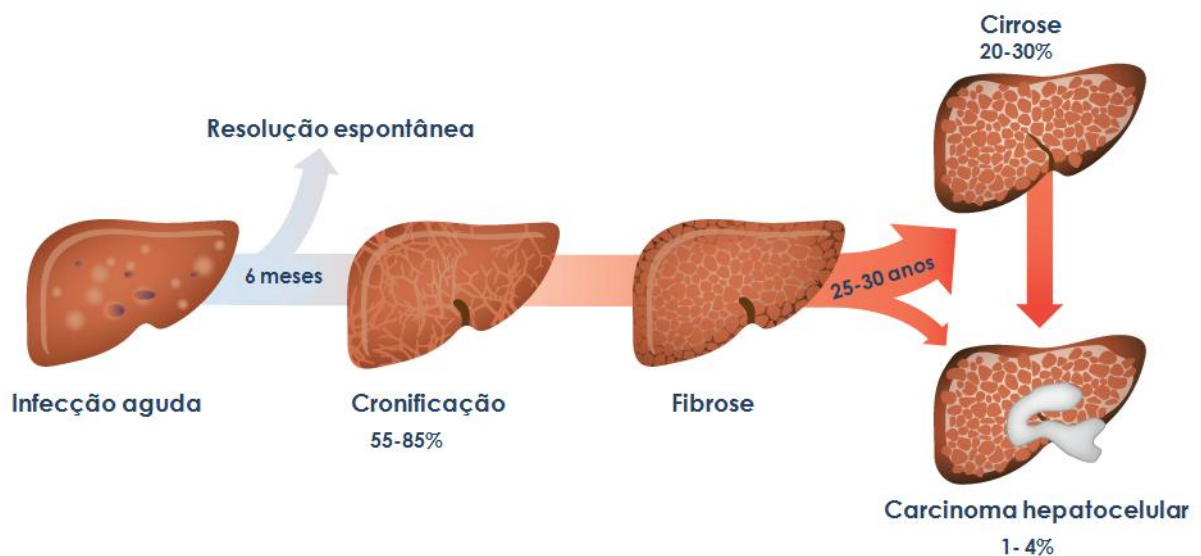


Figura 1. Evolução da infecção pelo vírus C. Após a exposição ao vírus, 55 a 85% dos casos cronificam. A evolução da doença em geral evolui com fibrose e cirrose em alguns casos. Uma parcela menor pode desenvolver carcinoma hepatocelular. Fonte: modificado de <http://dyingandgrief.com/causes-of-cirrhosis-of-the-liver>

2.1.1 Fibrose hepática

A fibrose hepática é definida pelo acúmulo de matriz extracelular (MEC) (23). A membrana basal normal, de baixa densidade, é substituída por tecido conjuntivo do tipo intersticial, de alta densidade, contendo colágeno fibrilar. A formação de tecido fibroso não depende apenas da síntese excessiva de matriz extracelular, mas também de deficiências na sua remoção. A evolução da fibrose constitui um processo complexo, com vários

componentes, sobretudo as células estreladas hepáticas (CEHs), citocinas, proteinases e seus inibidores (24).

As CEHs estão localizadas no espaço subendotelial (espaço de Disse), entre a superfície basolateral dos hepatócitos e o lado anti-luminal das células endoteliais sinusoidais (25) (Figura 2). As CEHs são os efetores primários da deposição da matriz-extracelular. No seu estado normal elas contêm gotículas intracelulares de vitamina A (24) e secretam e respondem a diversas quimiocinas, passando do estado quiescente para o estado ativado (fenótipo miofibroblástico)(26). A ativação das CEHs está associada à perda de gotículas de retinoide, aumento e proliferação celular, hipertrofia do retículo endoplasmático, aumento da produção de colágeno fibrilar (colágeno tipo I e II) e expressão de α -actina específica da musculatura lisa (α -SMA) (24).

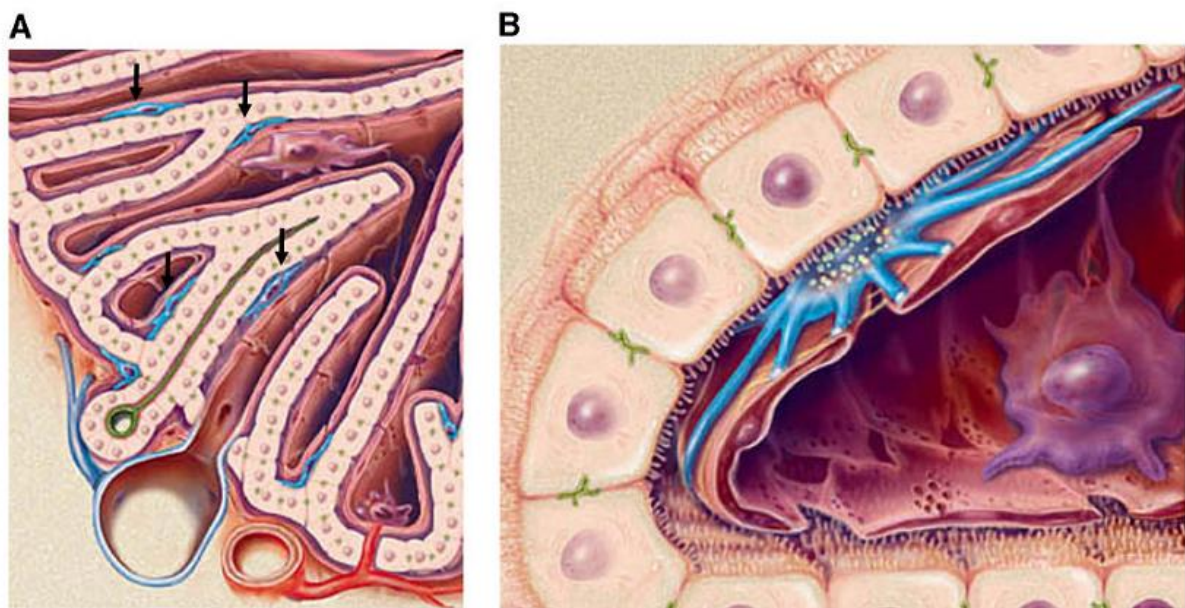


Figura 2. Morfologia das células estreladas hepáticas no fígado normal. A: diagrama do sinusoide hepático demonstrando a orientação relativa de células estreladas (em azul, indicado com setas) dentro da arquitetura sinusoidal. B: Células estreladas dentro do espaço de Disse. Fonte: Friedman, *Physiol Rev*, 2008.

O primeiro passo na ativação das CEHs reflete a estimulação parácrina pelas células vizinhas: células de Kupffer (macrófagos residentes do fígado), hepatócitos e leucócitos; enquanto citocinas autócrinas, fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) e fator de crescimento do tecido conetivo (CTGF), tem papel fundamental em propagar a ativação (Figura 3). Os hepatócitos lesados liberam citocinas responsáveis pela ativação das células de Kupffer e pelo recrutamento de células T ativadas: TGF- β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento insulínico (IGF). Células de Kupffer ativadas, linfócitos T e hepatócitos também liberam citocinas inflamatórias (TNF- α , interferon γ (INF- γ), IL-6), radicais livres e fatores de crescimento (fator de crescimento plaquetário (PDGF), CTGF) que induzem ativação e proliferação das CHEs. Com isso, ocorre o acúmulo de MEC que resulta tanto da síntese exacerbada como da degradação diminuída. A composição da matriz sub-endotelial muda de colágeno tipo IV e laminina para colágeno fibrilar tipos I e III. No espaço extracelular, a degradação da matriz ocorre como consequência da ação da família de enzimas chamadas metaloproteinases de matriz (MMPs). As MMPs podem ser inibidas por inibidores de metaloproteinases (TIMPs). As CEHs ativadas produzem MMP-2, MMP-9 e MMP-3, que destroem a membrana basal, permitindo o recrutamento de células inflamatórias ao sítio de lesão (27).

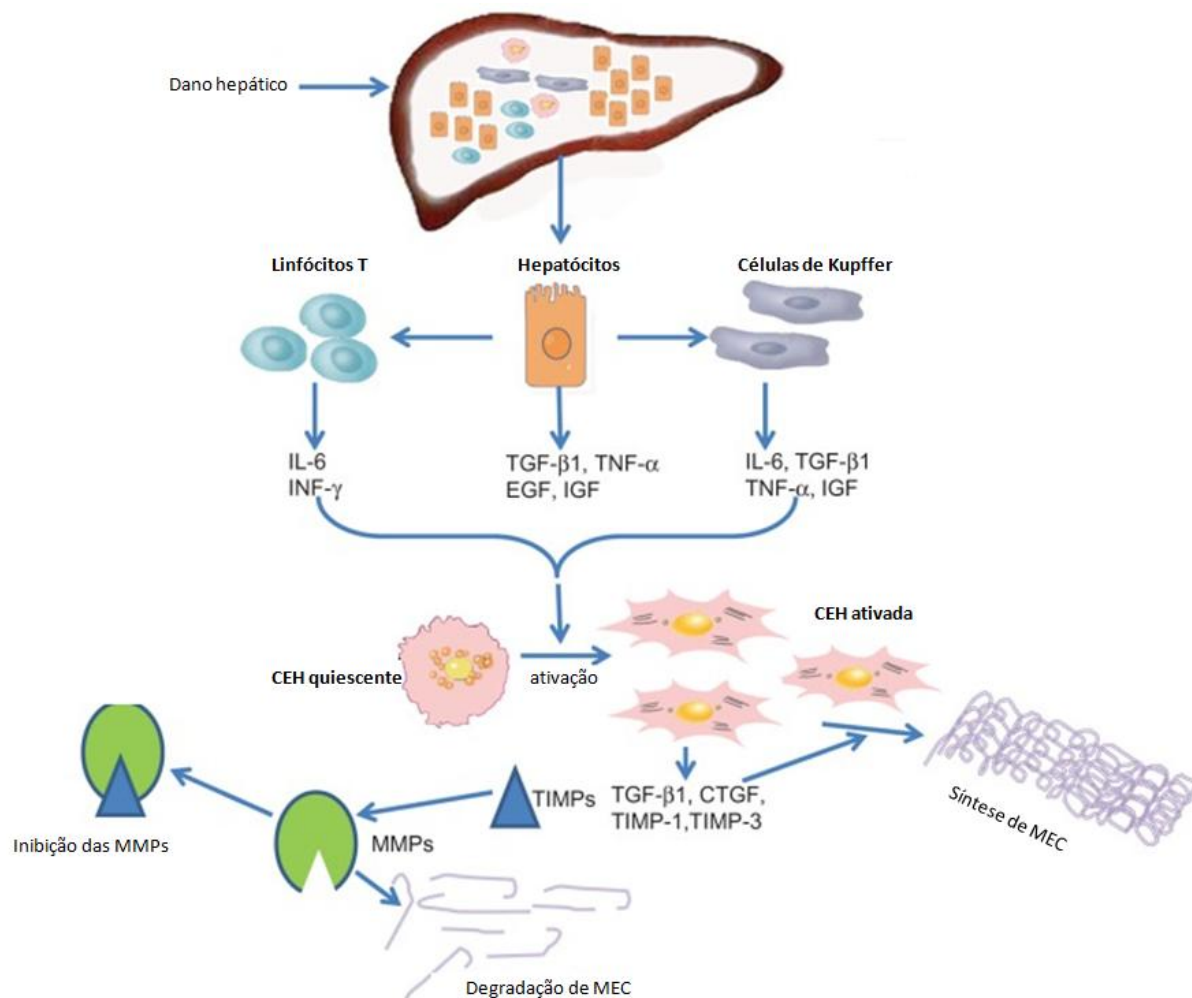


Figura 3. Mecanismos de fibrose hepática. IL-6: interleucina 6; INF- γ : interferon gama; TGF- β 1: fator de transformação de crescimento beta 1; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; EGF: fator de crescimento epidermal; IGF: fator de crescimento insulínico; CEH: célula estrelada hepática; MMPs: metaloproteinases de matriz; TIMPs: inibidores de metaloproteinases de matriz; CTGF: fator de crescimento do tecido conetivo; MEC: matriz extra celular. Fonte: Liu e col, Biomark Insights, 2012.

O TGF β -1 é a quimiocina com maior potencial fibrogênico no fígado e, após sua ligação aos receptores de membrana das CEHs, é capaz de desencadear a transcrição de diversos genes fibrogênicos através de seus efetores SMAD2/3, influenciando na ativação do fenótipo miofibroblástico das CEHs (26).

Um dos principais passos no manejo dos pacientes com HCC é o estadiamento do estágio da doença hepática, em particular da fibrose hepática. O estadiamento da fibrose é classicamente avaliado por biópsia. A biópsia permite não só o estadiamento da fibrose, mas também da atividade necroinflamatória. Sistemas de escores numéricos tornaram-se populares em ensaios clínicos dos anos 90 para tratamento das hepatites B e C (28). Os sistemas mais usados são escore Knodell (29), que tem apenas três estágios de fibrose (portal, pontes e cirrose), Batts-Ludwig (30) e Scheuer (31) com quatro estágios (portal, periportal, septos com nódulos e cirrose), METAVIR (32) com quatro estágios e Ishak (33) com seis estágios de fibrose (Quadro 1).

Quadro 1. Estadiamento da fibrose em biópsia hepática pelos escores Ishak e METAVIR.

Estágio	Descrição
Ishak	
0	Sem fibrose
1	Expansão fibrótica de alguns espaços-porta
2	Expansão fibrótica de diversos espaços-porta
3	Expansão fibrótica de diversos espaços-porta, com pontes porta-porta ocasionais
4	Expansão fibrótica de espaços-porta, com muitas pontes porta-porta e porta-centro
5	Muitas pontes porta-porta e porta-centro com nódulos incompletos
6	Cirrose
METAVIR	
0	Sem fibrose
1	Alargamento por fibrose restrito ao espaço-porta
2	Fibrose em espaço-porta
3	Fibrose com septos completos e esboço de nódulos
4	Cirrose

Particularmente na hepatite C crônica, erros de amostragem podem levar a um estadiamento equivocado da fibrose (34). Testes não invasivos estão cada vez mais presentes nas diretrizes nacionais e internacionais, deixando a biópsia hepática reservada para pacientes com diagnóstico e estadiamento problemáticos. A elastografia hepática é um método diagnóstico de fibrose através da medida da velocidade de propagação de ondas ultrassonográficas que atravessam o fígado. Quanto mais enrijecido o fígado em função da evolução da fibrose, maior será a velocidade de propagação das ondas (35).

Diversos fatores influenciam na formação da fibrose hepática na hepatite C, como a presença de necroinflamação, idade, consumo de álcool, duração da infecção, presença de coinfeções virais e alterações metabólicas como esteatose e resistência insulínica (36).

2.1.2 Evolução da hepatite C

Na história natural da HCC pode ocorrer fibrose e evolução à cirrose, que é caracterizada por uma fase assintomática, chamada de “cirrose compensada” seguida de uma rápida fase progressiva marcada pelo desenvolvimento de complicações de hipertensão portal e/ou disfunção hepática, denominada “cirrose descompensada” (3). Na fase compensada, a pressão portal pode ser normal ou abaixo do nível limiar identificado para o desenvolvimento de varizes ou ascite. A hipertensão portal é definida como a elevação do gradiente de pressão venosa hepática acima de 5 mmHg. A hipertensão portal ocorre por um aumento da resistência intra-hepática à passagem do sangue venoso devido à cirrose e por causa da vasodilatação esplâncnica (24).

Conforme a doença progride, há aumento da pressão portal e a perda função do fígado, resultando no desenvolvimento de ascite, sangramento gastrointestinal, encefalopatia e icterícia. O desenvolvimento de qualquer uma destas complicações marca a transição de uma fase compensada para uma fase descompensada. Progressão pode ser acelerada pelo

desenvolvimento de outras complicações, tais como insuficiência renal (ascite refratária, síndrome hepato-renal), síndrome hepatopulmonar e peritonite bacteriana espontânea (PBE). O desenvolvimento de CHC pode acelerar o curso da doença, em qualquer fase (3).

O diagnóstico de cirrose baseia-se também na evidência histopatológica de fibrose em estágio final (por exemplo, o estágio 4 no sistema METAVIR, ou estágios 5 ou 6 no sistema Ishak) (37). A elastografia é melhor para excluir do que para confirmar a presença de cirrose. Uma fibrose ≥ 2 METAVIR fica com valores próximos de 7,3-7,9 kPa, já o *cut-off* para diagnóstico de cirrose é 13,0-15,6 kPa (35). O diagnóstico da cirrose pode ser evidenciado também por exames de imagem (ultrassonografia e tomografia computadorizada). Como nem a biópsia, nem a ultrassonografia apresentam sensibilidade diagnóstica isolada maior de 90%, propõe-se que a ultrassonografia seja realizada antes da biópsia (24).

Uma forma de avaliação da cirrose e estimativa de prognóstico da doença é através de escores clínicos, sendo o sistema Child-Pugh-Turcotte (CPT) um deles (38). O escore varia de 5 a 15, onde de 5-6 CPT é considerado classe A (consistente com cirrose compensada); 7-9 classe B; e 10-15 classe C (Tabela 1). O escore CPT foi inicialmente descrito para estratificar os pacientes em grupos de risco no pré-operatório de cirurgia portal descompressiva. Ele é um sistema confiável para predizer o prognóstico de várias doenças hepáticas e também já foi utilizado como critério para alocação de fígado para transplante, mas foi substituído nestes casos pelo sistema MELD (*Model for End-Stage Liver Disease*) (39).

Tabela 1. Cálculo do escore Child-Pugh-Turcotte.

Fator	Unidade	1	2	3
Bilirrubina sérica	mg/dL	<2,0	2,0-3,0	>3,0
Albumina sérica	g/dL	>3,5	3,0-3,5	<3,0
Tempo de protrombina	INR	<1,7	1,7-2,3	>2,3
Ascite		Não	Facilmente controlável	Não controlável
Encefalopatia hepática		Não	Mínima	Avançada

A HCC é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (4). Aproximadamente 700.000 pessoas morrem de CHC a cada ano no mundo, fazendo dele a terceira causa de morte por câncer (40). Globalmente, a porcentagem de doentes com cirrose ou CHC que é atribuível a infecção pelo HCV foi estimada em 27% e 25%, respectivamente, resultando em um total de 211.000 mortes por cirrose e 155.000 mortes por CHC em 2002 (5). A classificação do CHC é dada pelo sistema BCLC (*Barcelona Clinic Liver Cancer*). Ele se divide em cinco estágios prognósticos e define tratamentos específicos para cada um deles (ressecção cirúrgica, transplante hepático, ablação por radiofrequência, quimioembolização e uso de sorafenibe) (41).

2.1.3 Tratamento

Em 1984 o primeiro estudo piloto para o tratamento da hepatite não-A não-B ocorreu com o uso de interferon (INF) no Centro Clínico do Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH- National Health Institute), sendo identificado que os pacientes com o vírus C genótipo 1 apresentavam taxas de cura muito baixas após 48 semanas de tratamento, em torno de 7-11% (Figura 4) (42). Em 1999 a associação de INF e ribavirina (RBV), um análogo nucleosídeo, se tornou o tratamento de escolha para hepatite C crônica. Logo em seguida o tratamento sofreu modificação, passando a ser usado interferon peguilado (PEG-INF) ao invés

do comum, o que aumentou as taxas da resposta virológica sustentada (RVS) para cerca de 40%, tornando-se este o tratamento padrão durante 10 anos.

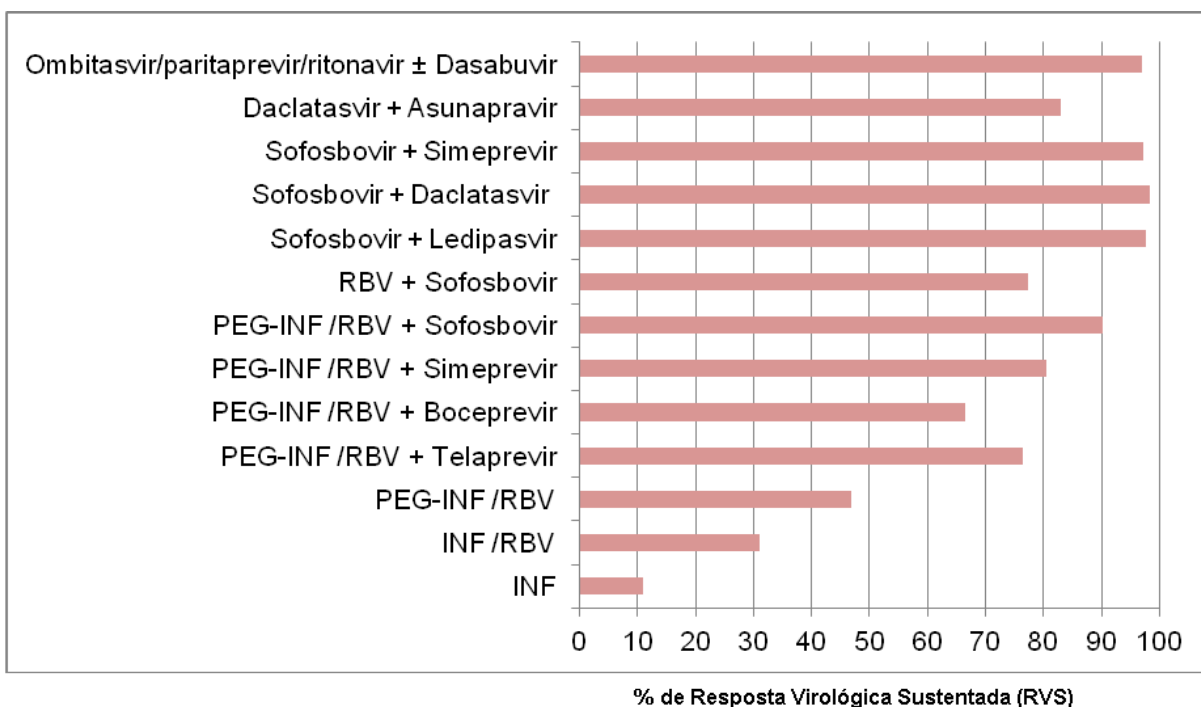


Figura 4. Taxas de resposta virológica sustentada em pacientes virgens de tratamento com hepatite C genótipos 1 e 4 em diversos regimes terapêuticos. RBV: ribavirina; INF: interferon; PEG-INF: interferon peguilado. Fonte: Adaptado de *Guidelines for the Screening Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis C Infection: Update Version*, OMS, 2016 e Pawlotsky et al, *Journal of Hepatology*, 2015.

Em 2009, o estudo IDEAL, desenhado para comparar a efetividade de três regimes de tratamento envolvendo PEG-INF α -2a e PEG-INF α -2b combinados com RBV, descreveu pela primeira vez o polimorfismo rs12979860 do gene *IL28B*, um forte preditor de resolução da hepatite C após o tratamento com INF-PEG e RBV (43). A coorte de 3070 pacientes portadores do vírus C mostrou que indivíduos homocigotos para o alelo C deste polimorfismo apresentavam taxas de RVS duas vezes maior que aqueles portadores do alelo T durante o tratamento com INF-PEG e RBV (43). O gene *IL28B* codifica o INF tipo III (λ 3), proteína

com potencial de induzir atividade antiviral em suas células alvo, assim como os INFs do tipo I (α/β) (44).

Infelizmente a descoberta do polimorfismo do gene *IL28B* chegou tarde, pois com o rápido avanço no conhecimento da estrutura molecular do vírus C e dos componentes de seu ciclo de vida, rapidamente foram desenvolvidos novos agentes antivirais diretos (DAA) em um ritmo memorável (45), com taxas de resposta muito superiores ao tratamento com INF-PEG/RBV (Figura 4). Os DAA visam sua ação em três alvos principais do vírus: a protease NS3/4A, a RNA polimerase NS5B e a proteína NS5A. Os inibidores de protease telaprevir e boceprevir foram aprovados em 2011 e foram a primeira classe de DAA que teve uso com sucesso na clínica (46), com taxas de RVS mais altas, porém também com maior toxicidade. Novas drogas têm sido desenvolvidas, proporcionando regimes terapêuticos livres de interferon e com taxas de resposta que excedem 90%, surgindo a possibilidade de erradicação da doença. Contudo, atingir a erradicação não é simples: o custo dos tratamentos é extremamente alto. No Brasil, por exemplo, apenas 15% dos indivíduos são diagnosticados e menos de 1% recebe tratamento, panorama que se reflete pelo resto do mundo (47). Algumas projeções mostram que até 2030, a incidência da infecção irá decrescer, no entanto, eventos relacionados à evolução da doença como descompensação da cirrose e carcinoma hepatocelular seguirão aumentando (39).

2.2 Vitamina D

A vitamina D foi descoberta em 1922, e em 1952, demonstrou-se que ela influenciava nos níveis séricos de cálcio e era necessária para a função neuromuscular. A vitamina D é um hormônio essencial para o crescimento e desenvolvimento normais, com efeitos bem documentados em ossos, músculos e homeostase mineral. Nos últimos anos se tem demonstrado que a vitamina D desempenha um papel crucial em muitas doenças agudas e

crônicas, não só afetando a qualidade óssea, mas também aumentando o risco de fraturas, de doenças autoimunes e de câncer (6, 48).

2.2.1 *Metabolismo da vitamina D*

A vitamina D é uma molécula lipofílica complexa, cuja fórmula elementar é $C_{27}H_{44}O$ e refere-se a um grupo de compostos esteroides chamados vitamina D3 (colecalfiferol) e vitamina D2 (ergocalciferol) (6). O ergocalciferol difere do colecalfiferol por possuir uma dupla ligação entre os carbonos 22 e 23 e um grupo metil (CH_3) no carbono 24 (Figura 5) (49). A vitamina D3 pode ser obtida endogenamente pela foto conversão (exposição solar) do 7-dehidrocolesterol em pré-vitamina D3 na pele (Figura 5), que é convertida em vitamina D3 por isomerização térmica. A vitamina D3 é transportada para o fígado ligada à proteína ligante de vitamina D (DBP), também conhecida como GC-globulina. (50). Numa porção menor, ela pode ser obtida da dieta, por alimentos como salmão e atum, já a vitamina D2 é encontrada em plantas ou derivados de plantas (Tabela 3). Após ingestão, ambas são incorporadas em quilomícrons, sendo absorvidas no intestino, onde seguem para o fígado. A vitamina D é hidroxilada no fígado pelas enzimas do citocromo P450 (principalmente a isoforma CYP2R1) em 25(OH) vitamina D (25(OH)D) e secretada na circulação ligada à DBP. Este composto sofre outra hidroxilação pela CYP27B1 nos rins, sendo convertida a 1,25(OH) vitamina D (1,25(OH)D), a forma ativa. A enzima CYP24A1 é responsável por catabolizar o excesso de 25 (OH)D e 1,25(OH)D para que sejam excretados como produtos na bile. A forma ativa é secretada ligada a DBP e atinge seus tecidos alvos ligando-se ao seu receptor nuclear- receptor de vitamina D (VDR). O VDR forma um heterodímero com o receptor retinoide (RXR), se ligando a elementos responsivos a vitamina D (VDREs) no DNA, promovendo a expressão ou supressão de vários genes- muitos deles

relacionados à resposta imune. É estimado que a 1,25(OH)D regule em torno de 2000 genes (50).

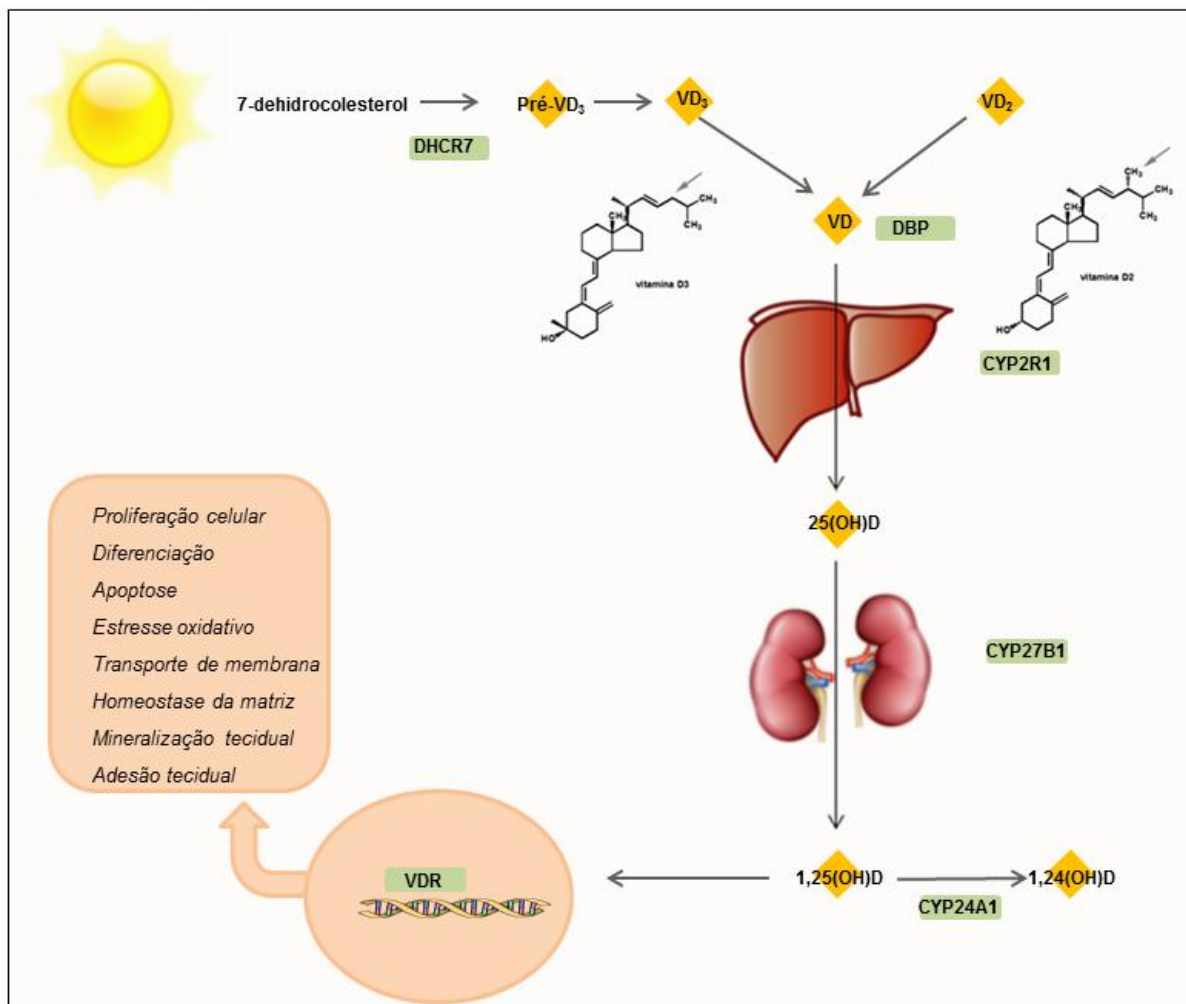


Figura 5. Metabolismo da vitamina D. Seta: assinalado o grupamento metila que difere entre vitamina D₃ e D₂; DHCR7: 7-deidrocolesterol redutase; Pré-VD₃: pré-vitamina D₃; VD₃: vitamina D₃; VD₂: vitamina D₂; VD: vitamina D; 25(OH)D: 25-hidroxi vitamina D; 1,25(OH)D: 1,25-hidroxi vitamina D; 1,24(OH)D: 1,24-hidroxi vitamina D; DBP: proteína ligante de vitamina D; CYP2R1: citocromo P450 2R1; CYP27B1: citocromo P450 27B1; CYP24A1: citocromo P450 24A1; VDR: receptor de vitamina D. Fonte: Peixoto e cols, Pesquisa Vet Brasil, 2012; Lugg e cols, Dis Markers, 2015.

Tabela 2. Fontes alimentares de vitamina D.

Alimento	Porção	Conteúdo de vitamina D
Salmão selvagem	100g	600 - 1.000 UI de vitamina D ₃
Salmão de criação	100g	100 - 250 UI de vitamina D ₃
Sardinha em conserva	100g	300 UI de vitamina D ₃
Cavala em conserva	100g	250 UI de vitamina D ₃
Atum em conserva	100g	230 UI de vitamina D ₃
Óleo de fígado de bacalhau	5 mL	400 - 1.000 UI de vitamina D ₃
Gema de ovo	1 unidade	20 UI de vitamina D ₃
Cogumelos frescos	100g	100 UI de vitamina D ₃
Cogumelos frescos ao sol	100g	1.600 UI de vitamina D ₃

Fonte: Adaptado de Holick, 2007.

Polimorfismos nos genes envolvidos na síntese, transporte e metabolização da vitamina D sabidamente afetam seus níveis circulantes, principalmente nos *loci* codificados pelos genes *GC*, *DHCR7* e *CYP2R1* (8-10). O gene *GC*, que codifica a GC-globulina, é o que mais consistentemente mostra polimorfismos relacionados com os níveis séricos de vitamina D, sendo o rs4588 T/G e o rs7041 C/A os mais estudados (51), pois levam a troca de aminoácidos. Os diferentes haplótipos (GA, GC e TA) dão origem as três isoformas principais da proteína, Gc1F, Gc1S e Gc2, que são compostos por um ácido aspártico e uma treonina, um ácido glutâmico e uma treonina e um ácido aspártico e uma lisina, respectivamente (52). A isoforma Gc-2 (haplótipo TA) é descrita como tendo a menor afinidade por seu ligante (53) e responsável por níveis de vitamina D menores (54). A influência dos polimorfismos do *VDR* nos níveis séricos de vitamina D é controversa, tendo aparentemente pouca influência (55).

2.2.2 Recomendações de diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D

O metabólito 25(OH)D é utilizado para determinar o status de vitamina D. Ele é o que circula em maior quantidade, tem meia-vida de 2-3 semanas e representa tanto a vitamina D

ingerida quanto a formada por exposição solar. Embora a 1,25(OH)D seja o metabólito ativo, ela tem meia-vida de apenas 4-6 horas, está presente em quantidades mil vezes menor do que a 25(OH)D e conforme o paciente vai se tornando deficiente, a quantidade de 1,25(OH)D aumenta em resposta ao paratormônio, o que faz dela um marcador inadequado(56).

É recomendado que os níveis séricos de 25(OH)D estejam acima de 30 ng/mL (suficiência). Níveis séricos entre 20 a 29 são considerados insuficiência, enquanto abaixo de 20ng/mL deficiência (7). Alguns autores consideram níveis inferiores a 10 ng/mL como deficiência grave (57, 58) já que abaixo desta concentração aumenta o risco de raquitismo e osteomalácia (59). A insuficiência de vitamina D é prevalente pelo mundo e afeta quase 50% de todos os grupos étnicos e faixas etárias, sendo uma questão de saúde pública, já que a hipovitaminose D é fator de risco para mortalidade por várias causas na população em geral (60). Muitos acreditam que a principal razão pela deficiência de vitamina D ser tão difundida se dê pela falta de exposição à radiação solar, já que a exposição à radiação UV está relacionada a uma maior incidência de câncer de pele (61).

A Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, assim como as diretrizes da Endocrine Society, não recomenda a avaliação da 25(OH)D para a população em geral, considerando os seus custos (7, 62). O valor tabelado para esta dosagem no Sistema Único de Saúde (SUS) é de R\$ 15,24, o que geralmente não cobre os custos do procedimento. Desta forma, a mensuração da vitamina D é recomendada às populações consideradas de risco para hipovitaminose D: pacientes com quadro de raquitismo ou osteomalácia, portadores de osteoporose, idosos com história de quedas e fraturas, obesos, grávidas e lactentes, pacientes com síndromes de má-absorção (fibrose cística, doença inflamatória intestinal, doença de Crohn, cirurgia bariátrica), insuficiência renal ou hepática, hiperparatiroidismo, medicações que interfiram no metabolismo da vitamina D (anticonvulsivantes, glicocorticoides,

antifúngicos, antirretrovirais, colestiramina, orlistat), doenças granulomatosas e linfomas. Da mesma forma, a suplementação generalizada de vitamina D não é recomendada, devendo ser realizada em indivíduos sabidamente deficientes ou nas populações de risco(62). As doses diárias recomendadas estão descritas na Tabela 4. Em indivíduos com níveis séricos diminuídos de 25(OH)D é recomendado dose de ataque no esquema de 50.000 UI/semana (ou 7.000 UI/dia) de vitamina D por 6 a 8 semanas (7).

Tabela 3. Doses diárias recomendadas para população em geral e populações de risco.

Faixas etárias	População geral (UI)	População de risco (UI)
0 - 12 meses	400	400 - 1.000
1 - 8 anos	400	600 - 1.000
9 - 18 anos	600	600 - 1.000
19 - 70 anos	600	1.500 - 2.000
> 70 anos	800	1.500 - 2.000
Gestantes 14 - 18 semanas	600	600 - 1.000
Gestantes > 18 semanas	600	1.500 - 2.000
Lactantes 14 - 18 anos	600	600 - 1.000
Lactantes > 18 anos	600	1.500 - 2.000

2.2.3 Vitamina D e doenças hepáticas

Nos últimos anos, a influência da vitamina D nas doenças do fígado tem sido amplamente discutida por esta ser claramente uma população de risco para hipovitaminose D e já este hormônio sofre metabolismo hepático. Existe claramente uma associação entre doenças hepáticas e deficiência de vitamina D, embora não seja muito clara qual a causa e qual a consequência (50, 61, 63-72).

Indivíduo com doenças hepáticas, e em especial com hepatite C tem maior prevalência de deficiência de vitamina D. Em um estudo com 496 pacientes com HCC provenientes de

hospitais suíços, a mediana de 25(OH)D foi de 13,4ng/mL, sendo 74% com níveis inferiores a 20ng/mL (73). Quando indivíduos com hepatite C genótipo 1 são comparados a controles hígidos, a diferença também é notável: média de 25,1 ng/mL versus 43,1 ng/mL (74).

Além disso, a deficiência de vitamina D parece ser acompanhada de um pior prognóstico da doença hepática. Baur e colaboradores descreveram que indivíduos com HCC METAVIR 2 apresentavam 15,5 ng/mL frente aos 22,2 ng/mL dos indivíduos METAVIR 0/1 (11), e da mesma forma, existe uma relação inversa entre os níveis de 25(OH)D com escore Child-Pugh-Turcotte (12) e com estágios do sistema BCLC no carcinoma hepatocelular (75). O estudo EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*), uma coorte europeia com 520 mil indivíduos, desenhada para investigar associação entre dieta, estilo de vida na incidência de diversos cânceres, demonstrou que o risco de desenvolver CHC era maior entre aqueles com deficiência de vitamina D (25(OH)D <20ng/mL) (13).

Níveis séricos diminuídos de vitamina D também estão associados a maior chance de falha ao tratamento com INF-PEG/RBV na hepatite C. Em uma recente meta-análise, foi identificado que dentre indivíduos com hepatite C (genótipos 1, 2, 3 e 4), aqueles com níveis inferiores a 20 ng/mL apresentavam maior risco de não apresentar RVS (OR=0,53; IC= 0,31-0,91) (14). Um ensaio clínico japonês descreveu que a suplementação de vitamina D3 aumentou as taxas de RVS em pacientes com HCC com genótipo *IL28B* rs8099917 desfavorável durante o tratamento com simeprevir, interferon peguilado e ribavirina (76).

Os níveis séricos de 25(OH)D flutuam muito como consequência da variação à exposição solar durante as estações, tipo de alimentação, presença de comorbidades, suplementação de vitamina D e outros, e tendo isso em mente é importante também avaliar as diferentes variantes genéticas do metabolismo da vitamina D, que poderiam oferecer uma avaliação do status de vitamina D a longo termo. Estudos já demonstraram que alguns dos

polimorfismos diretamente envolvidos nos níveis séricos de vitamina D também se relacionam com os estágios da doença hepática. O polimorfismo rs12785878 no gene da enzima colesterol redutase (*DHCR7*) já foi associado com o maior grau de fibrose hepática, avaliada tanto por biópsia como por elastografia hepática (36, 77). Já os polimorfismos rs2282679 (*GC*) e rs1993116 (*CYP2R1*) foram relacionados ao risco de desenvolvimento de CHC (78).

Nesse sentido, outro gene que ganhou importância foi o *VDR*, o gene do receptor de 1,25(OH)D. Os hepatócitos exibem pouca ou nenhuma expressão de *VDR*, mas ele está altamente expresso nas células não parenquimatosas do fígado, como células de Kupffer, células endoteliais e CEHs (79). Em indivíduos com HCC, a expressão proteica de *VDR* no fígado é inversamente proporcional à gravidade de fibrose e inflamação (80, 81). Modelos *knockout* em ratos revelam que a fibrose hepática espontânea ocorre quando um ou ambos os alelos do *VDR* são suprimidos, com fibrose mais severa observada em animais *VDR*^{-/-} (15).

Ding e colaboradores propuseram que a vitamina D diminui a fibrose hepática limitando a ativação das CEHs através de um efeito mediado pela interação *VDR*/*SMAD3* (Figura 6) (15). O *VDR* co-ocupa 10.436 sítios genômicos que são ativados pelo *SMAD3*, efetor da cascata do *TGFβ*, mostrando uma interação entre os dois fatores de transcrição em HSCs. O *VDR* após a ligação de seu agonista compete pelos mesmos locais que o *SMAD3*, inibindo a transcrição de genes pró-fibrogênese que são ativados pelo *TGFβ*/*SMAD*. Modelos experimentais em animais e *in vitro* tem demonstrado que a suplementação de vitamina D é capaz de prevenir de reverter a formação de fibrose hepática por inibir a ativação das CEHs, inibir a formação de colágeno do tipo I bem como aumentar a atividade da metaloproteinase 9 (15, 82-85).

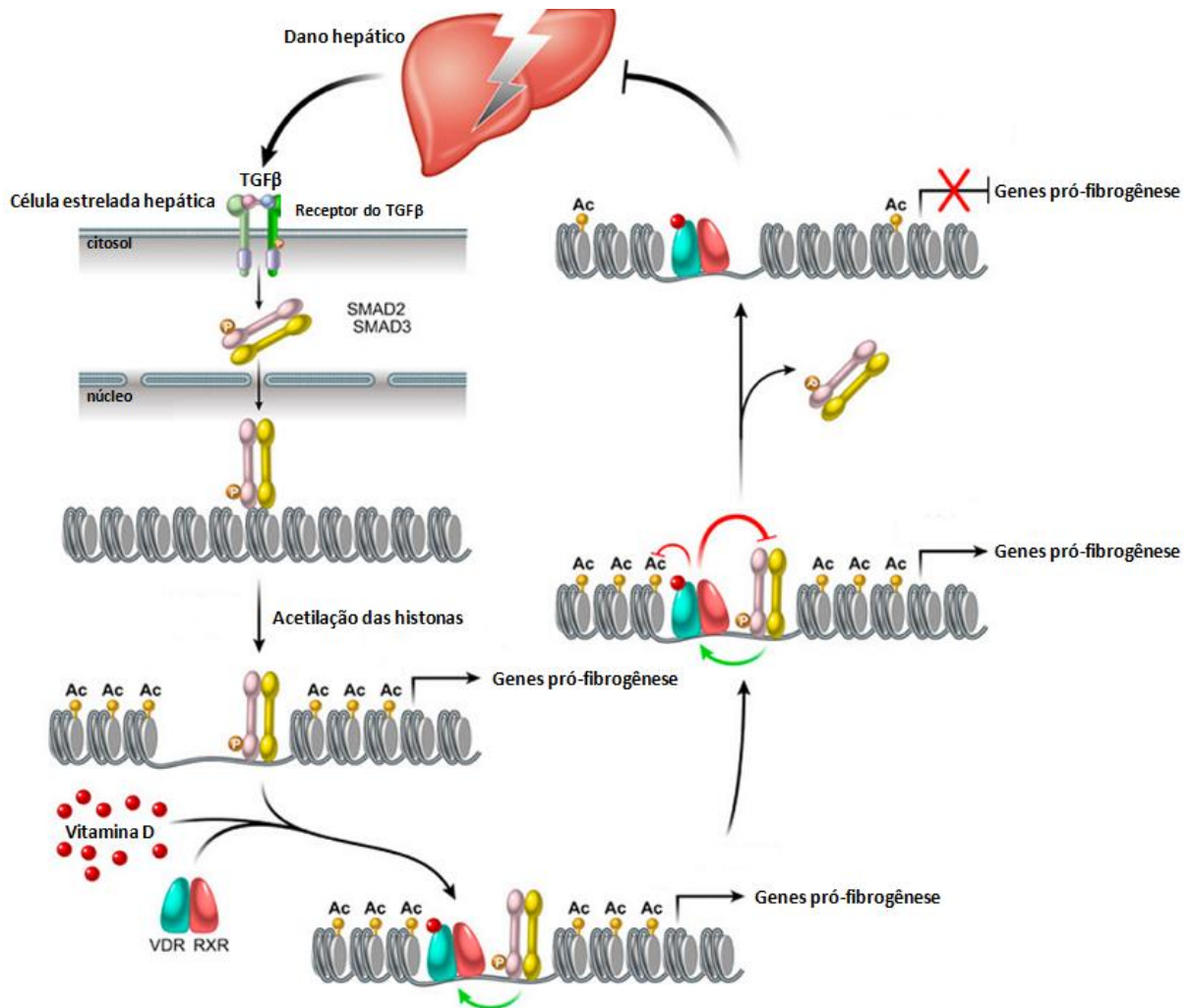


Figura 6. Modelo proposto da interação genômica VDR/SMAD no controle da resposta de genes pró-fibrogênese em células estreladas hepáticas. TGFβ: fator de transformação de crescimento beta; Ac: acetilação das histonas; VDR: receptor de vitamina D; RXR: receptor de retinóide X. Fonte: Ding e col, Cell, 2013.

Uma das variantes genéticas mais comuns no *VDR* é o haplótipo bAt que consiste em três *loci* polimórficos (rs1544410 T/C , rs7975232 A/C e rs731236 G/A) . O haplótipo bAt[CCA] já foi associado a taxa de progressão da fibrose e cirrose (11) e ao desenvolvimento de CHC (86, 87). Além destes, outros polimorfismos no *VDR* já foram relacionados a uma maior expressão de TGFβ, α-SMA e colágeno 1-α em CEHs de origem humana (88).

Dois polimorfismos do *TGFBI*, rs1800469 e rs1800471, já foram relacionados à piora da fibrose e desenvolvimento de CHC em pacientes com HCC (89-91). Embora nenhum polimorfismo no gene do *SMAD3* tenha sido relacionado a doenças hepáticas, os polimorfismos rs9806504, rs11071932 e rs2118610 foram associados à formação de queleide em indivíduos afro-caribenhos (92). O queleide é um tumor benigno dérmico fibroproliferativo, caracterizado por um acúmulo excessivo de proteínas da matriz extracelular, conduzindo a uma superprodução de colágeno (93). Na Tabela 5 são apresentados 44 polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo da vitamina D e na possível interação TGFb1-SMAD3-VDR.

Tabela 4. Polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo da vitamina D e da interação TGFB1/SMAD3/VDR que tenham relação com níveis séricos de vitamina D e processos relacionados a evolução da doença hepática.

Crom	Gene	Proteína	SNP	Alelos	Posição (pb)	Associação reportada	Citação
4	GC	DBP	rs17467825	A/G	72605517	Níveis séricos de Vitamina D	Batai et al. 2014 ; Wang et al. 2010
			rs2282679	T/G	72608383	Níveis séricos de Vitamina D, CHC	Ahn et al. 2010; Batai et al. 2014; Lange et al. 2013; Lu et al. 2012; Signorello et al. 2011; Wang et al. 2010
			rs3755967	T/C	72609398	Níveis séricos de Vitamina D	Batai et al. 2014; Wang et al. 2010
			rs2298850	C/G	72614267	Níveis séricos de Vitamina D	Batai et al. 2014; Wang et al. 2010
			rs4588	T/G	72618323	Níveis séricos de Vitamina D	Ahn et al. 2010; Batai et al. 2014 ; Lu et al. 2012; Wang et al. 2010
			rs7041	C/A	72618334	Níveis séricos de Vitamina D	Ahn et al. 2010 ; Batai et al. 2014; Lu et al. 2012 ; Wang et al. 2010
			rs222020	C/T	72636272	Níveis séricos de Vitamina D	Bu et al. 2010 ; Porter et al. 2013
			rs1155563	C/T	72643488	Níveis séricos de Vitamina D	Ahn et al. 2010 ; Batai et al. 2014 ; Lu et al. 2012 ; Wang et al. 2010
			rs2298849	G/A	72648851	Níveis séricos de Vitamina D	Bu et al. 2010; Signorello et al. 2011
			rs115316390	A/G	72651159	Níveis séricos de Vitamina D	Batai et al. 2014
			rs221999	G/A	72649048	Níveis séricos de Vitamina D	Wjst et al. 2006
11	DHCR7	DHCR7	rs1790349	T/C	71142350	Níveis séricos de Vitamina D	Ahn et al. 2010 ; Lu et al. 2012
			rs7944926	A/G	71165625	Níveis séricos de Vitamina D	Wang et al. 2010
			rs12785878	G/T	71167449	Níveis séricos de Vitamina D, Fibrose hepática	Grunhage et al. 2012; Petta et al. 2013 ; Wang et al. 2010
			rs4944957	A/G	71168035	Níveis séricos de Vitamina D	Wang et al. 2010
			rs12800438	A/G	71171003	Níveis séricos de Vitamina D	Wang et al. 2010
			rs3794060	C/T	71187679	Níveis séricos de Vitamina D	Wang et al. 2010
			rs3829251	A/G	71194559	Níveis séricos de Vitamina D	Ahn et al. 2010; Lu et al. 2012
			rs4945008	A/G	71221248	Níveis séricos de Vitamina D	Wang et al. 2010
			rs11234027	A/G	71234107	Níveis séricos de Vitamina D	Ahn et al. 2010
11	CYP2R1	CYP2R1	rs7116978	C/T	14881771	Níveis séricos de Vitamina D	Wang et al. 2010
			rs1993116	G/A	14910234	Níveis séricos de Vitamina D, CHC	Ahn et al. 2010; Batai et al. 2014; Lange et al. 2013; Wang et al. 2010
			rs10500804	G/T	14910273	Níveis séricos de Vitamina D	Wang et al. 2010
			rs12794714	A/G	14913575	Níveis séricos de Vitamina D	Batai et al. 2014 ; Bu et al. 2010 ; Wang et al. 2010
			rs10741657	A/G	14914878	Níveis séricos de Vitamina D	Batai et al. 2014; Bu et al. 2010 ; Ramos-Lopez et al. 2008 ; Wang et al. 2010
			rs2060793	A/G	14915310	Níveis séricos de Vitamina D	Ahn et al. 2010 ; Batai et al. 2014 ; Lu et al. 2012 ; Wang et al. 2010
			rs1562902	C/T	14918216	Níveis séricos de Vitamina D	Bu et al. 2010 ; Wjst et al. 2006
rs10766197	A/G	14921880	Níveis séricos de Vitamina D	Bu et al. 2010 ; Wjst et al. 2006			
12	CYP27B1	CYP27B1	rs10877012	G/T	58162085	Níveis séricos de Vitamina D	Ramos-Lopez et al. 2008; Signorello et al. 2011
12	VDR	VDR	rs731236	G/A	48238757	Fibrose hepática, CHC	Baur et al. 2012 ; Beilfuss et al. 2015; Falletti et al. 2010
			rs7975232	A/C	48238837	Fibrose hepática, CHC	Baur et al. 2012 ; Beilfuss et al. 2015 ; Falletti et al. 2010; Hung et al. 2014
			rs757343	T/C	48239675	Fibrose hepática	Beilfuss et al. 2015 ; Mohy and Fouad 2014

			rs1544410	T/C	48239835	Fibrose hepática, CHC	<i>Baur et al. 2012 ; Beilfuss et al. 2015 ; Falletti et al. 2010</i>
			rs2239186	G/A	48269410	Níveis séricos de Vitamina D	<i>Wjst et al. 2006</i>
			rs4516035	C/T	48299826	Fibrose hepática	<i>Beilfuss et al. 2015</i>
15	<i>SMAD3</i>	SMAD3	rs9806504	C/T	67392777	Quelóide	<i>Brown et al. 2008</i>
			rs11071932	A/G	67399546	Quelóide	<i>Brown et al. 2008</i>
			rs2118610	T/C	67428334	Quelóide	<i>Brown et al. 2008</i>
19	<i>TGFB1</i>	TGFβ-1	rs1800471	C/G	41858876	Fibrose hepática	<i>Eurich et al. 2011 ; Sanchez-Parada et al. 2013</i>
			rs1800469	G/A	41860296	Cirrose, CHC	<i>Ma et al. 2015 ; Radwan et al. 2012</i>
20	<i>CYP24A1</i>	CYP24A1	rs2296241	A/G	52786219	Níveis séricos de Vitamina D	<i>Wjst et al. 2006</i>
			rs17219315	A/G	52788446	Níveis séricos de Vitamina D	<i>Wjst et al. 2006</i>
			rs73913757	C/T	52790518	Níveis séricos de Vitamina D	<i>Batai et al. 2014</i>
			rs2244719	C/T	52782858	Níveis séricos de Vitamina D	<i>Wjst et al. 2006</i>

2.3 Imputação Genômica

Uma das melhores formas de identificar variantes genéticas que tragam susceptibilidade para diferentes doenças complexas é através dos estudos de associação genômica GWAS (*Genome-Wide Association Study*). Os GWAS se tornaram possíveis pela disponibilidade da tecnologia baseada em chips de *microarray*, onde milhões de polimorfismos podem ser identificados, em especial os polimorfismos onde há apenas a troca de uma única base (SNP-*Single Nucleotide Polymorphism*). Dependendo da quantidade de SNPs avaliados, o custo de um projeto pode ser muito caro. O NIH (National Institute of Health) disponibiliza através do dbGaP (*database of Genotypes and Phenotypes*) (94, 95) uma plataforma onde é possível ter acesso a dados de diversos estudos de GWAS, que receberam fomento deste e outros órgãos, mediante solicitação de pesquisadores interessados.

Embora muitos polimorfismos possam ser identificados nos estudos de GWAS, ainda assim, sabe-se que existe mais de 50 milhões de variantes genéticas, o que faz com que apenas uma pequena fração seja identificada nestes estudos (96). Imputação genômica é uma técnica estatística estabelecida utilizada para estimar genótipos que não foram diretamente determinados em GWAS (97). Através de um painel de referência, com haplótipos

conhecidos, pode se inferir os SNPs faltantes pelo seu desequilíbrio de ligação, utilizando ferramentas estatísticas (Figura 7) (98). O desequilíbrio de ligação especifica que quanto mais próximo fisicamente dois alelos estão no mesmo cromossomo mais eles tendem a estar ligados um ao outro (99).

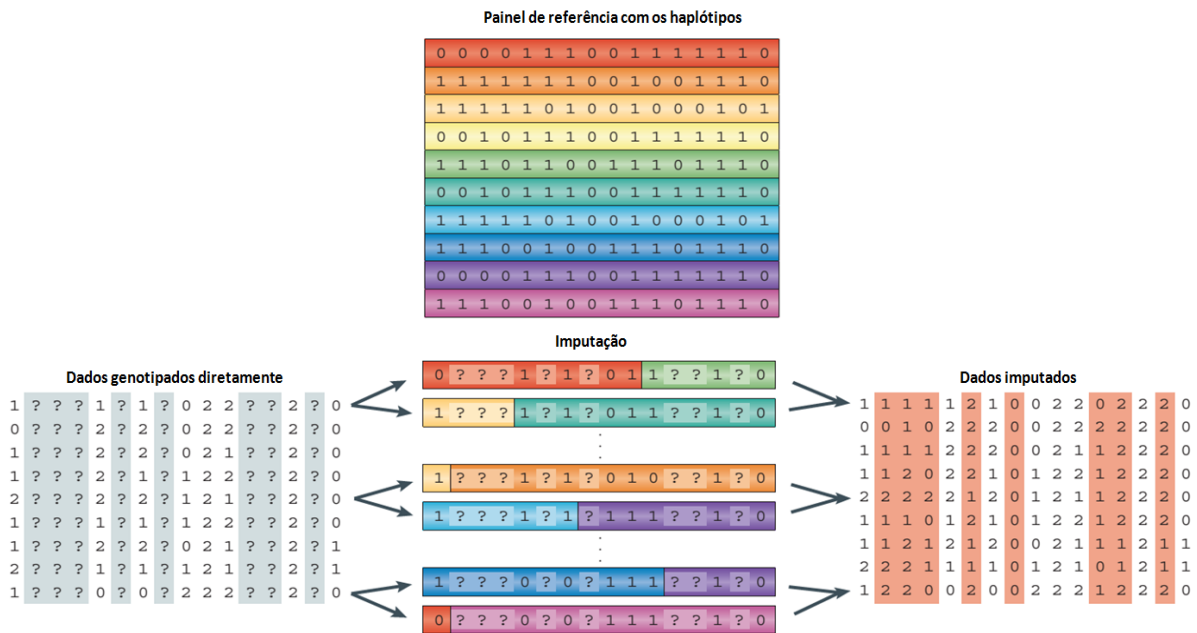


Figura 7. Imputação genômica de uma amostra de indivíduos não relacionados. Os haplótipos dos indivíduos genotipados diretamente são comparados aos haplótipos dos indivíduos do painel de referência. Os dados faltantes são imputados com o uso de modelos estatísticos. Fonte: Marchini, Nature, 2010.

A imputação é feita por meio de ferramentas de bioinformática, com softwares específicos. Dentre os softwares mais comumente utilizados e que são de uso livre podemos destacar: BEAGLE(100), IMPUTE2 (101), MACH(102) e Mach-Admix (103). Todos utilizam o Modelo Oculto de Markov para prever os SNPs faltantes (104).

Os painéis de referência mais comumente usados são os Projeto HapMap (105) e 1000 Genomes (106), ambos consórcios internacionais. No HapMap 2.5 milhões de variantes estão

discriminadas, embora variantes raras não estejam bem determinadas, bem como não estão incluídas inserções/deleções e variações estruturais (107). Já no 1000 Genomes estão caracterizados o genoma completo de 2504 indivíduos de 26 diferentes populações, sendo identificados 88 milhões de variantes (84,7 milhões de SNPs, 3,6 milhões de inserções/deleções e 60mil variantes estruturais) (108).

2.4 HALT-C (*Hepatitis C Antiviral Long-term Treatment against Cirrhosis*)

O HALT-C (*Hepatitis C Antiviral Long-term Treatment against Cirrhosis*) foi um estudo multicêntrico, randomizado e controlado, desenhado para determinar se o uso continuado de interferon a longo prazo preveniria a progressão para cirrose e carcinoma hepatocelular e reduziria a necessidade de transplante de fígado em pacientes com hepatite C crônica com fibrose avançada. O estudo foi apoiado e coordenado pelo NIDDK (Instituto Nacional de Diabetes e Doenças Digestivas e Renais), uma filial do NIH em conjunto com universidades norte-americanas (109).

A população de estudo foi limitada aqueles indivíduos com fibrose avançada ou cirrose evidenciada na biópsia e que tivessem recebido pelo menos 12 semanas de terapia com interferon alfa e que não tivessem erradicado o vírus. Como os pacientes arrolados receberam uma variada gama de tratamentos com interferon, para garantir que todos recebessem um tratamento ótimo com interferon, foi oferecido a todos um período de Lead-in.

Durante o *lead-in* todos os pacientes receberam peginterferon alfa-2-a 180µg/semana e ribavirina 1000-1200mg/dia por um período de 24 semanas. Os indivíduos que tivessem carga indetectável na semana 20 seguiam tratamento até a semana 48, visando atingir RVS. Os que tivessem carga detectável na semana 20 eram randomizados para receber peginterferon alfa-2a 90µg/semana ou nenhum tratamento por 3,5 anos. Os pacientes respondedores da semana

20 que tivessem carga detectável nas semanas 36, 48, 60 ou 72 (não respondedores parciais ou recidivantes) tiveram o tratamento descontinuado e também foram encaminhados para randomização (Figura 8).

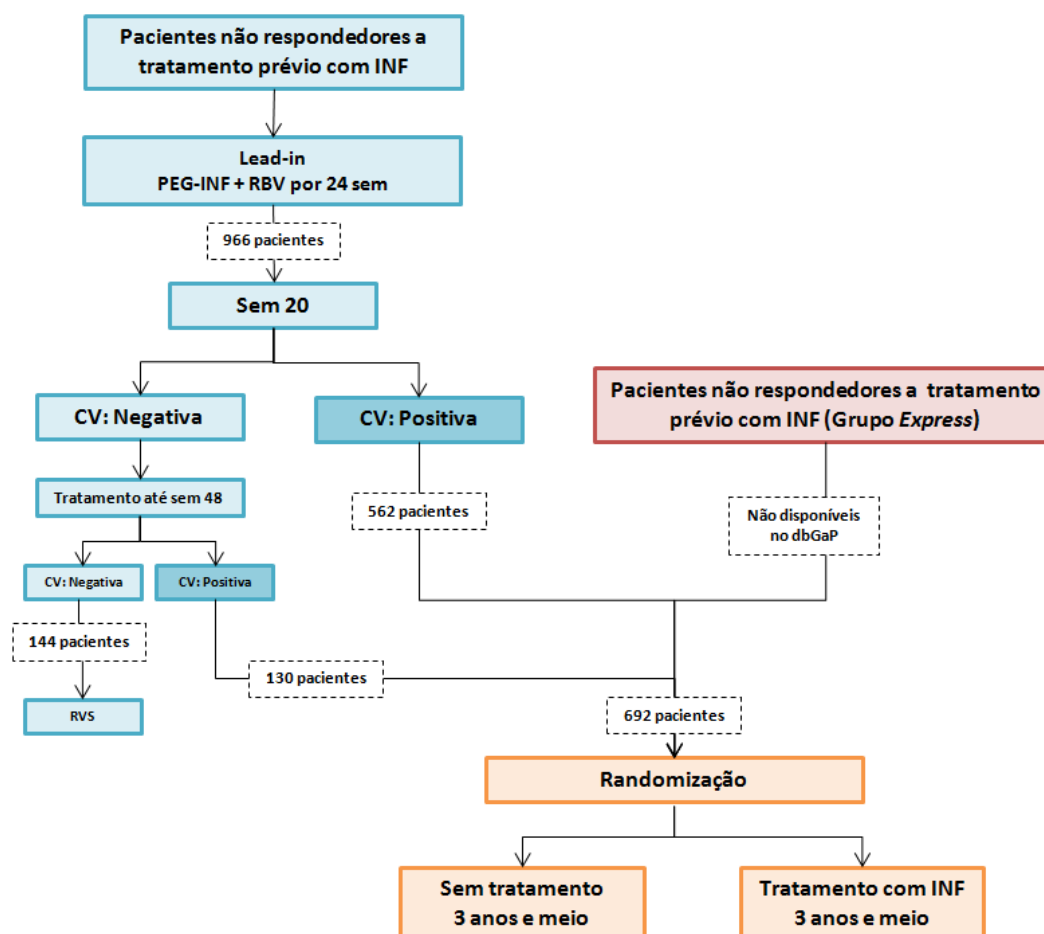


Figura 8. Desenho do estudo HALT-C. HALT-C: *Hepatitis C Antiviral Long-term Treatment against Cirrhosis*; INF: interferon; PEG-INF: interferon peguilado; RBV: ribavirina; sem: semanas; CV: carga viral; RVS: resposta virológica sustentada; dbGaP: *database of Genotypes and Phenotypes*. Fonte: Lee e col, Control Clin Trials, 2004.

Como houve uma demora maior do que esperado para se conseguir arrolar os pacientes para a randomização, o estudo aceitou também pacientes tratados com interferon-

alfa-2b ou alfa-2a de fora do ensaio HALT-C, que tivessem todos critérios de inclusão preenchidos (Grupo *Express*).

As duas principais hipóteses do estudo foram:

- Em paciente com HCC e fibrose avançada o tratamento com interferon pode prevenir a cirrose.
- Em pacientes com cirrose secundária à HCC, o tratamento com interferon pode reduzir o risco de descompensação hepática ou de carcinoma hepatocelular.

Como resultados do ensaio clínico, os autores descreveram que manter a terapia com interferon foi associada com diminuição dos níveis séricos de RNA HCV, de alanina aminotransferase e do escore necroinflamatório. No entanto, não houve associação com a redução de fibrose e demais desfechos clínicos. A progressão da doença hepática ocorreu em 34,1% dos pacientes tratados e em 33,8% dos pacientes não-tratados. Como conclusão, os autores determinaram que o uso prolongado de interferon não apresentou efeito e não deveria ser utilizado em pacientes não respondedores ao tratamento com interferon (110).

O estudo HALT-C encontra-se disponível na plataforma dbGaP (phs000430.v1.p1). No que diz respeito aos dados fornecidos pelo dbGaP, estão disponíveis as informações clínicas e genotípica sobre 966 indivíduos que foram submetidos a Lead-in no estudo. Destes, 692 foram randomizados, não estando disponível a informação sobre em quais grupos os pacientes foram randomizados. As variáveis disponibilizadas no banco de dados encontram-se descritas no Anexo 13.1 – Variáveis disponíveis na plataforma dbGaP.

3 JUSTIFICATIVA

A hepatite C crônica é uma doença com distribuição mundial, que possui enorme impacto em termos de saúde pública. Conhecer os fatores envolvidos na progressão desta doença é de suma importância para identificar aqueles indivíduos com chance de evolução para um quadro mais grave.

O papel da vitamina D na evolução da hepatite C crônica tem se tornado cada vez mais evidente nos últimos anos e sua influência na doença hepática está longe de ter sido elucidada. Os genes envolvidos no metabolismo da vitamina D regulam desde sua formação, até seu efeito nos tecidos biológicos. A literatura demonstra que não só níveis séricos de vitamina D, mas também polimorfismos envolvidos na sua rota metabólica podem apresentar relação com a progressão do vírus C.

A seleção criteriosa e fundamentada de polimorfismos em uma determinada rota metabólica é crucial para que se possa avaliar o quanto o perfil genético de um indivíduo é capaz de influenciar na evolução de uma doença. Desta forma, a avaliação sérica de vitamina D, aliada à identificação das variantes genéticas envolvidas em seu metabolismo, poderia contribuir na caracterização dos fatores associados à progressão da hepatite C crônica.

4 QUESTÃO DE PESQUISA

Os níveis séricos de vitamina D, bem como os polimorfismos envolvidos na sua rota metabólica, influenciam na progressão da doença hepática causada pela hepatite C crônica?

5 HIPÓTESE

Os níveis séricos de vitamina D, bem como os polimorfismos envolvidos na sua rota metabólica, influenciam na progressão da doença hepática causada pela hepatite C crônica.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Avaliar, em duas amostras distintas, a influência dos níveis séricos de vitamina D e dos polimorfismos da sua rota metabólica na progressão da doença hepática causada pela hepatite C crônica.

6.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a associação dos níveis séricos de vitamina D no grau de fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica genótipo 1.
2. Avaliar a associação dos polimorfismos rs7041 e rs4588 do gene *GC* nos níveis séricos de vitamina D em pacientes com hepatite C crônica genótipo 1.
3. Avaliar a associação dos polimorfismos rs7041 e rs4588 do gene *GC* no grau de fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica genótipo 1.
4. Avaliar a associação de 44 polimorfismos dos genes *DHCR7*, *GC*, *CYP2R1*, *CYP24A1*, *CYP27B1*, *VDR*, *SMAD3* e *TGFBI* em uma coorte de pacientes com hepatite C crônica sobre os seguintes desfechos primários:
 - piora da fibrose hepática (aumento de dois pontos no escore Ishak);
 - descompensação hepática (presença de pelo menos um: sangramento de varizes gástricas ou esofágicas, escore Child-Turcotte-Pugh Score (CTP) >7, ascite, peritonite bacteriana espontânea e encefalopatia hepática);
 - desenvolvimento de carcinoma hepatocelular;
 - morte do fígado.

5. Avaliar a associação de 44 polimorfismos dos genes *DHCR7*, *GC*, *CYP2R1*, *CYP24A1*, *CYP27B1*, *VDR*, *SMAD3* e *TGFBI* em uma coorte de pacientes com hepatite C crônica sobre os seguintes desfechos secundários:

- sangramento de varizes gástricas ou esofágicas;
- escore Child-Turcotte-Pugh Score (CTP) >7;
- ascite;
- peritonite bacteriana espontânea;
- encefalopatia hepática.

7 ARTIGOS

7.1 Artigo 1

Effect of vitamin D serum levels and GC gene polymorphisms in liver fibrosis due to chronic hepatitis C.

7.2 Artigo 2

Genetic variants underlying vitamin D metabolism and VDR-TGF β -1-SMAD3 interaction may impact on HCV progression. A study based on dbGaP data from the HALT-C study.

8 CAPÍTULO 1

Título: *Effect of vitamin D serum levels and GC gene polymorphisms in liver fibrosis due to chronic hepatitis C.*

Periódico: *Annals of Hepatology*

ISSN: 1665-2681

Página na internet: <http://www.annalsofhepatology.com/>

Status: Aceito, *in press*.

Title page

Effect of vitamin D serum levels and GC gene polymorphisms in liver fibrosis due to chronic hepatitis C.

Short title

Vitamin D and GC gene in liver fibrosis

Authors

Laura A. Azevedo¹, Ursula Matte^{2,3}, Themis R. Silveira^{1,3}, Jacqueline W. Bonfanti⁴, Juliana P. Bruch¹, Mário R. Álvares-da-Silva^{1,4}

1 Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

2 Department of Genetics; Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

3 Graduate Program in Child and Adolescence Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

4 Department of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Division of Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Keywords

Liver disease; 25-hydroxyvitamin D; Gc-globulin; genetics.

Authors contribution

Study conception and design: LAA; UM; TRS; MRAS. Performed the experiments: LAA; JWB; JPB. Analyzed the data: LAA. Wrote the paper: LAA; UM; TRS; JPB; JWB; MRAS. Critical revision: UM; TRS; MRAS.

Corresponding author:

Laura Alencastro de Azevedo, Master, PhD Student

Avenida Ipiranga 2752, sala 303

Porto Alegre, RS, Brazil. CEP: 90610-000

Phone: +55 51 33085412

Fax: +55 51 33085437

laura.alencastro@ufrgs.br

Abbreviations

ECM	Extracellular matrix
CHC	Chronic hepatitis C
DHCR7	7-dehydrocholesterol
25(OH)D	25-hydroxyvitamin D
1,25(OH)D	1,25-dihydroxyvitamin D
VDR	Vitamin D receptor
ALT	alanine aminotransferase
AST	aspartate aminotransferase
GGT	gamma-glutamyl-transferase
BMI	Body Mass Index
SVR	Sustained Virological Response

Financial support

The authors would like to thank Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), Programa de Apoio à Pós-Graduação da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROAP-CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Abstract

Introduction and aim: Vitamin D has been associated with chronic liver diseases and low vitamin levels may contribute to progression of chronic hepatitis C. The aim of this study was to evaluate the influence of vitamin D serum levels and GC gene polymorphisms in the severity of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C genotype 1. **Materials and Methods:** Cross-sectional study that enrolled 132 adult patients with chronic hepatitis C genotype 1 attended at the outpatient Clinic of Gastroenterology Division at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. At the time of enrollment patients had a blood withdraw for serum 25(OH)D determination and genotypic analysis of rs7041 and rs4588 polymorphisms in GC gene. None/mild fibrosis was considered as METAVIR F0, F1 and F2 and severe fibrosis as METAVIR F3 and F4. **Results:** Median 25(OH)D levels in the sample were 19.9ng/mL (P25-P75: 14.0–29.4). Fifty percent of patients presented vitamin D deficiency (<20ng/mL). In stepwise multiple linear regression the variables associated with 25(OH)D levels were blood withdrawn in Winter/spring season, the haplotypes AT/AT + AG/AT of rs7041 and rs4588 and female sex. For evaluation of severe fibrosis, variables associated in logistic regression were age, vitamin D severe deficiency (<10ng/mL), glucose levels, BMI and platelets count. **Conclusions:** Vitamin D levels are associated with severity of liver fibrosis in chronic hepatitis C genotype 1 patients. Although the rs7041 and rs4588 GC polymorphisms are strong predictors of vitamin D levels, they do not play a direct role in liver fibrosis.

Introduction

Liver fibrosis is defined by extracellular matrix (ECM) accumulation with consequent loss of liver function, due to acute or chronic damage (1). Chronic hepatitis C (CHC) leads to liver fibrosis and 20-30% of patients progress to cirrhosis after 25-30 years of infection (2). Several factors influence the evolution of CHC and formation of liver fibrosis, such as age, obesity, virus C genotype, alcohol consumption, duration of infection, presence of viral co-infections and metabolic disorders (2).

Vitamin D has been associated with chronic liver diseases and low vitamin levels may contribute to progression of CHC (3). Vitamin D is mainly synthesized in the skin by 7-dehydrocholesterol (DHCR7) in pre-vitamin D, which is converted into vitamin D by isomerization. Vitamin D and its metabolites circulate bounded to vitamin D-binding protein (GC-globulin). Vitamin D goes under hydroxylation in the liver by cytochrome P450 enzymes forming 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) and is used to evaluate vitamin D status. The metabolite 25(OH)D is hydroxylated by CYP27B1 in the kidney, producing 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)D), the active form that binds to vitamin D receptor (VDR) (4). Vitamin D deficiency is a risk factor for all-cause mortality in the general population (5) as well as for cirrhotic patients (6).

GC-globulin is coded by *GC* gene. The three protein isoforms are coded by different alleles, which are formed by single nucleotide polymorphisms (SNPs). Polymorphism rs7041 has two alternative alleles, containing either A or C, and polymorphism rs4588 has either G or T. Each person carries two copies of the *GC* gene; therefore possible genotypes for rs7041 are AA, AC or CC, for example. Different SNPs at the same gene are inherited together forming a haplotype. For rs7041 and rs4588 possible haplotypes are CT, CG or AT. These two SNPs are responsible for the three major circulating isoforms of GC-globulin Gc1F (CT), Gc1S (CG) and Gc2rs (AT) (7). The Gc-2 isoform is described to have the lowest affinity for its ligand (8). The three common haplotype variants combined form CT-CT, CT-CG, CG-CG, CG-AT, CT-AT and AT-AT.

It is known that several polymorphisms involved in the vitamin D metabolism are associated with its serum concentrations (9,10). The aim of this study was to evaluate the influence of vitamin D serum levels and GC polymorphisms in the severity of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C genotype 1.

Materials and Methods

This was a cross-sectional study that enrolled 132 adult patients with chronic hepatitis C genotype 1 attended at the outpatient Clinic of Gastroenterology Division at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, from June 2013 to February 2015. Hepatitis C virus infection was confirmed by anti-HCV ELISA 3 and by detection of viral RNA by polymerase chain reaction (HCV RNA PCR). Patients infected by the human immunodeficiency virus (HIV) or hepatitis B virus (HBV), alcohol abusers (>40 g/day), chronic renal injured, liver transplanted, decompensated cirrhotic and those with hepatocellular

carcinoma (HCC) or in immunosuppressive or antiviral treatment were excluded. Both naïve and previously PEG-INF treated patients were included.

At the time of the enrollment patients had a blood withdraw for vitamin D serum levels determination and genotypic analysis. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl-transferase (GGT), platelets, glucose, cholesterol and body mass index (BMI) were extracted from patient's chart from the previous 6 months. Severity of fibrosis was evaluated by the last liver biopsy done by the outpatients Clinic routine. Liver biopsies were evaluated by the same pathologist and scored with METAVIR system (11). Serum 25(OH)D levels were determined using a chemoluminescent immunoassay on a Liaison automatic analyzer (DiaSorin). Vitamin D levels below 10ng/mL were considered severe deficiency; 10 to 20ng/mL deficiency; 20 to 30ng/mL insufficiency; and above 30ng/mL sufficiency (12). Date of sample collection was categorized into two seasons, Summer/autumn (December-May) and Winter/spring (June-November). The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the hospital Ethical Committee. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Genotypic analysis

The genomic DNA was extracted from whole blood EDTA using Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) according to manufacturer's instructions. The polymorphisms rs7041 and rs4588 from the GC gene were identified using hydrolysis probes (TaqMan Assays; ABI), IDs: C_3133594_30 and C_8278879_10, respectively. A total of 10 ng of DNA was used in a final reaction volume of 12.5 µl for real-time PCR on StepOne™ System (Thermo Fisher).

Statistical analysis

Categorical variables are presented as frequencies. Continuous variables with normal distribution are presented as mean and standard deviation and variables with non-normal distribution as median and interquartile range (P25-P75). To check the normal distribution of the variables, a Shapiro-Wilk test was applied. Associations between continuous variables were carried out with T Test, Mann-Whitney or Kruskal-Wallis as appropriated and associations between categorical variables were evaluated with Fisher's Exact Test. Stepwise multiple linear regression analysis with a forward approach using a cutoff value of 0.05 was performed to identify independent predictors of 25(OH)D levels. Stepwise logistic regression analysis with a forward approach using a cutoff value of 0.05 was performed to identify independent predictors of liver fibrosis. Variables included in the model were sex, age, fibrosis (none/mild or severe), diabetes mellitus, BMI, ALT, AST, GGT, cholesterol, glucose, platelets, rs4588 and rs7041 haplotypes (AT/AT + AG/AT vs others), season of blood withdrawn (Summer/Autumn vs Winter/Spring). For analysis purposes none/mild fibrosis was considered as METAVIR F0, F1 and F2 and severe fibrosis as METAVIR F3 and F4 (cirrhosis). A chi-square test was employed to verify whether the proportions of the two polymorphisms were distributed in accordance with the Hardy-Weinberg Equilibrium. Haplotypes for rs7041 and rs4588 were statistically reconstructed using the PHASE program, version 2.1, which implements a Bayesian statistical method for haplotyping

reconstructing from genotype data (13, 14). Statistical analysis was performed using SPSS 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Significance level was set at $\alpha < 0.05$.

Results

Patient features

Demographical, clinical, biochemical and genotypic features of enrolled patients are described in Table 1. Patients' age varied from 26 to 74 years. The majority of patients were cirrhotic (33.3%). Median 25(OH)D levels were 19.9ng/mL (14.0 – 29.4). Fifty percent of patients presented deficiency or severe deficiency of vitamin D.

Genotypes and alleles frequencies of rs7041 and rs4588 were in Hardy Weinberg Equilibrium. The most frequent genotypes were AC for rs7041 and GG for rs4588 (Table 2). Finally, for haplotypes, GC/TA, GC/GC and GC/GC were the most common ones.

Predictors of 25(OH)D serum levels

Vitamin D levels were higher in patients enrolled in Summer/Autumn than in Winter/Fall (31.2ng/mL (IQR 19.8-35.0) versus 18.4ng/mL (IQR 12.8-24.1); $P < 0.001$) (Figure 1). Median 25(OH)D levels was 18.0 ng/mL (12.7 - 23.2) for females and 24.0 ng/mL (17.2 - 31.8) for males ($P = 0.002$). Vitamin D did not differ between naïve and PEG-INF treated patients ($P = 0.921$). When 25(OH)D serum levels were stratified among rs7041 and rs4588 genotypes and haplotypes, there was no statistical significance ($P > 0.05$), however a trend is graphically observed for AA genotype of rs7041 and TT genotype of rs4588, as well as for AT/AT and AG/AT haplotypes (Figure 2). Transforming the mentioned genotypes and haplotypes into dichotomous variables, it is observed that 25(OH)D levels are lower for AA genotype of rs7041, TT genotype of rs4588 and AT/AT + AG/AT haplotypes when compared to their counterparts (Table 3). In multiple linear regression the variables associated with diminished 25(OH)D circulating levels were blood withdrawn in Winter/Spring, the risk haplotypes AT/AT + AG/AT and female sex (Table 4).

Variables related to liver fibrosis

In Table 5 are presented the association of studied variables with severity of liver fibrosis. Older age; higher BMI, ALT, GGT and glucose; lower platelets and 25(OH)D; diabetes and severe vitamin D deficiency were related to severe liver fibrosis in bivariate analysis. None of the evaluated genotypes and haplotypes of rs7041 and rs4588 were associated with fibrosis severity. In the logistic regression analysis were included sex, age, 25(OH)D > 10 ng/mL, season of blood withdrawn (Summer/Autumn vs Winter/Spring), diabetes mellitus, BMI, ALT, AST, GGT, cholesterol, glucose, platelets, rs4588 and rs7041 haplotypes (AT/AT + AG/AT vs others). The variables that remained in the model were age, 25(OH)D < 10 ng/mL, glucose levels, BMI and platelets count. When 25(OH)D is included as a continuous variable it loses statistical significance in the model.

Discussion

In recent years, the influence of vitamin D in liver diseases has been broadly discussed since it undergoes hepatic metabolism. Herein we evaluated the association of vitamin D serum levels and of rs7041 and rs4588 polymorphisms from *GC* gene in severe liver fibrosis in a sample of 132 chronic hepatitis C genotype 1 patients.

In this sample, vitamin D median levels were 19.9 ng/mL and deficiency prevalence was 50%. In a study with 496 CHC patients from Swiss hospitals, median 25(OH)D was 13.4ng/mL, and 74% presented levels below 20.0 ng/mL (15). It has been described that the prevalence of vitamin D insufficiency and deficiency in patients with chronic liver disease ranges between 64 and 92% (16).

Serum levels of 25 (OH)D fluctuate strongly as a result of variations in sunlight exposure during the season, type of food, presence of comorbidities, vitamin D supplementation and others. It is important to also evaluate the different genetic variants of vitamin D metabolism, which could provide an assessment of long term vitamin D status. In multiple regression analysis, 25(OH)D levels were influenced by season, sex and genetic factors. Polymorphisms in genes involved in synthesis, transport and vitamin D metabolism are known to affect its circulating levels, especially in *GC*, *DHCR7* and *CYP2R1* loci (7, 8, 17). The *GC* gene codifies the protein responsible for carrying vitamin D and its metabolites in the circulation and in our study the haplotypes AT/AT and AG/AT were responsible for the lower levels of vitamin D, showing that the T allele of rs4588 has the biggest influence in vitamin D levels. Our findings are similar to Santos et al, which found the same results in healthy Brazilian girls (18). The Gc-2 isoform is described to have the lowest affinity for its ligand, which is in accordance confirming the lowest levels of vitamin D described in both studies (10).

Vitamin D deficiency seems to be associated with a poorer prognosis of the liver disease. In this sample, a difference in 25(OH)D serum levels was observed in none/mild and severe fibrosis (21.1 *versus* 18.1 ng/mL; $P=0.014$). Baur et al reported that individuals with CHC METAVIR 2 presented 15.5ng/mL 25(OH)D levels compared to 22.2ng/mL of individuals METAVIR 0/1 (19). Meanwhile, Petta described that CHC G1 with Scheuer scoring 0-2 presented 25.5ng/mL *versus* 21.9 ng/mL from patients Scheuer scoring of 3-4 (20). In our sample the overall prevalence of severe deficiency was 13.6% (18/132), in patients with none/mild fibrosis was 5.6% (4/72) and in patients with severe fibrosis was 23.3% (14/60). In a cohort of German CHC patients, severe deficiency prevalence was 25% (21). In logistic regression, severe vitamin D deficiency was associated with severe fibrosis along with age, BMI and platelets count. Although the studied polymorphisms have presented association with vitamin D circulating levels, they were not related to liver fibrosis. There are studies that have shown that polymorphisms of vitamin D metabolism relate to the stages of liver disease. Studies from Petta and Grünhage identified the polymorphism rs12785878 in the gene of cholesterol reductase (*DHCR7*) associated with a greater degree of liver fibrosis (22, 23). This polymorphism was not evaluated in the present sample. Another gene that is important in liver fibrosis is *VDR*, since it can downregulate the

activation of hepatic stellate cells by competing for several genomic sites related to fibrosis, which are activated by *SMAD3*, an effector of the transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) (24). The rs1544410, rs7975232 and rs731236 polymorphisms have been associated with the rate of progression of fibrosis and cirrhosis (19).

As limitation of this study we could cite that some cofounding factors were not analyzed, such as smoking, intravenous drug use, duration of HCV infection. Also, it was a cross-sectional study that analyzed only two polymorphisms. Although the sample size is relatively small, we considered as a main strength the use of a well-defined cohort of HCV genotype 1 patients that represent the real-world experience. Our results corroborate the literature findings, whereas lower vitamin D levels are found among patients with higher liver fibrosis. Identifying those patients is important since oral supplementation of vitamin D is a very simple therapeutic measure. Several studies have demonstrated that vitamin D deficiency is likely to be related to lower odds of sustained virological response (SVR) to treatment with pegylated interferon plus ribavirin (25) and recently, in a Japanese trial, vitamin D3 supplementation increased SVR rates on refractory CHC patients on treatment with simeprevir, pegylated interferon plus ribavirin (26).

In summary, vitamin D levels were associated with severity of liver fibrosis in chronic hepatitis C genotype 1 patients. Although the rs7041 and rs4588 *GC* gene polymorphisms are strong predictors of vitamin D levels, they do not play a direct role in liver fibrosis.

References

1. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669.
2. Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterol Clin North Am* 2015; 44: 717-734.
3. Iruzubieta P, Teran A, Crespo J, Fabrega E. Vitamin D deficiency in chronic liver disease. *World J Hepatol* 2014; 6: 901-915.
4. Stokes CS, Volmer DA, Grunhage F, Lammert F. Vitamin D in chronic liver disease. *Liver International* 2013; 33: 338-352.
5. Schottker B, Jorde R, Peasey A, Thorand B, Jansen EH, Groot L, Streppel M, et al. Vitamin D and mortality: meta-analysis of individual participant data from a large consortium of cohort studies from Europe and the United States. *BMJ* 2014; 348: g3656.
6. Stokes CS, Krawczyk M, Reichel C, Lammert F, Grunhage F. Vitamin D deficiency is associated with mortality in patients with advanced liver cirrhosis. *European Journal of Clinical Investigation* 2014; 44: 176-183.
7. Christiansen M, Jorgensen CS, Laursen I, Hirschberg D, Hojrup P, Houen G. Protein chemical characterization of Gc globulin (vitamin D-binding protein) isoforms; Gc-1f, Gc-1s and Gc-2. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1774: 481-492.
8. Arnaud J, Constans J. Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP). *Hum Genet* 1993; 92: 183-188.
9. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, Kiel DP, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010; 376: 180-188.
10. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Simon KC, McCullough ML, Gallicchio L, Jacobs EJ, et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 2739-2745.

11. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996; 24: 289-293.
12. Pearce SH, Cheetham TD. Diagnosis and management of vitamin D deficiency. *BMJ* 2010; 340 :b5664.
13. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics* 2001; 68: 978-989.
14. Stephens M, Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *American Journal of Human Genetics* 2005; 76: 449-462.
15. Lange CM, Bibert S, Kutalik Z, Burgisser P, Cerny A, Dufour JF, Geier A, et al. A genetic validation study reveals a role of vitamin D metabolism in the response to interferon-alfa-based therapy of chronic hepatitis C. *Plos One* 2012; 7: e40159.
16. Konstantakis C, Tselekouni P, Kalafateli M, Triantos C. Vitamin D deficiency in patients with liver cirrhosis. *Ann Gastroenterol* 2016;29:297-306. doi: 10.20524/aog.2016.0037.
17. Batai K, Murphy AB, Shah E, Ruden M, Newsome J, Agate S, Dixon MA, et al. Common vitamin D pathway gene variants reveal contrasting effects on serum vitamin D levels in African Americans and European Americans. *Hum Genet* 2014; 133: 1395-1405.
18. Santos BR, Mascarenhas LPG, Boguszewski MCS, Spritzer PM. Variations in the Vitamin D-Binding Protein (DBP) Gene Are Related to Lower 25-Hydroxyvitamin D Levels in Healthy Girls: A Cross-Sectional Study. *Hormone Research in Paediatrics* 2013; 79: 162-168.
19. Baur K, Mertens JC, Schmitt J, Iwata R, Stieger B, Eloranta JJ, Frei P, et al. Combined effect of 25-OH vitamin D plasma levels and genetic Vitamin D Receptor (NR 111) variants on fibrosis progression rate in HCV patients. *Liver International* 2012; 32: 635-643.
20. Petta S, Grimaudo S, Di Marco V, Scazzone C, Macaluso FS, Camma C, Cabibi D, et al. Association of vitamin D serum levels and its common genetic determinants, with severity of liver fibrosis in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat* 2013; 20: 486-493.
21. Lange CM, Bojunga J, Ramos-Lopez E, von Wagner M, Hassler A, Vermehren J, Herrmann E, et al. Vitamin D deficiency and a CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon-alfa based therapy. *Journal of Hepatology* 2011; 54: 887-893.
22. Petta S, Grimaudo S, Di Marco V, Scazzone C, Macaluso FS, Camma C, Cabibi D, et al. Association of Vitamin D Serum Levels and Its Common Genetic Determinants, with Severity of Liver Fibrosis in Genotype 1 Chronic Hepatitis C Patients. *Journal of Hepatology* 2013; 58: S194-S194.
23. Grunhage F, Hochrath K, Krawczyk M, Hoblinger A, Obermayer-Pietsch B, Geisel J, Trauner M, et al. Common genetic variation in vitamin D metabolism is associated with liver stiffness. *Hepatology* 2012; 56: 1883-1891.
24. Ding N, Yu RT, Subramaniam N, Sherman MH, Wilson C, Rao R, Leblanc M, et al. A Vitamin D Receptor/SMAD Genomic Circuit Gates Hepatic Fibrotic Response. *Cell* 2013; 153: 601-613.
25. Garcia-Alvarez M, Pineda-Tenor D, Jimenez-Sousa MA, Fernandez-Rodriguez A, Guzman-Fulgencio M, Resino S. Relationship of vitamin D status with advanced liver fibrosis and response to hepatitis C virus therapy: a meta-analysis. *Hepatology* 2014; 60: 1541-1550.
26. Atsukawa M, Tsubota A, Shimada N, Yoshizawa K, Abe H, Asano T, Ohkubo Y, et al. Effect of native vitamin D3 supplementation on refractory chronic hepatitis C patients in simeprevir with pegylated interferon/ribavirin. *Hepatol Res* 2016; 46: 450-458.

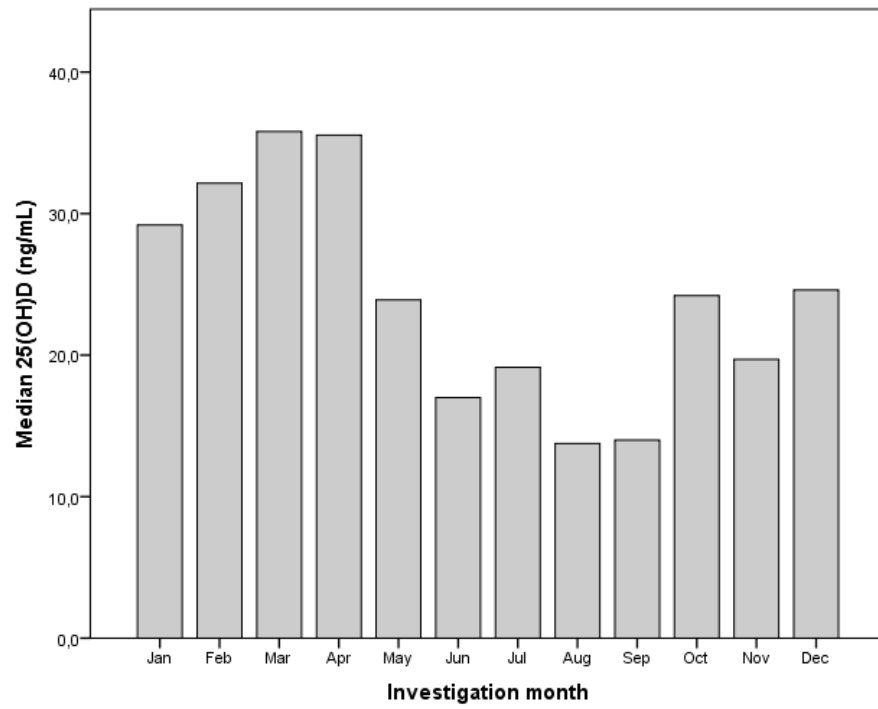


Figure 1. Median 25(OH)D serum levels of the enrolled patients according to investigation month.

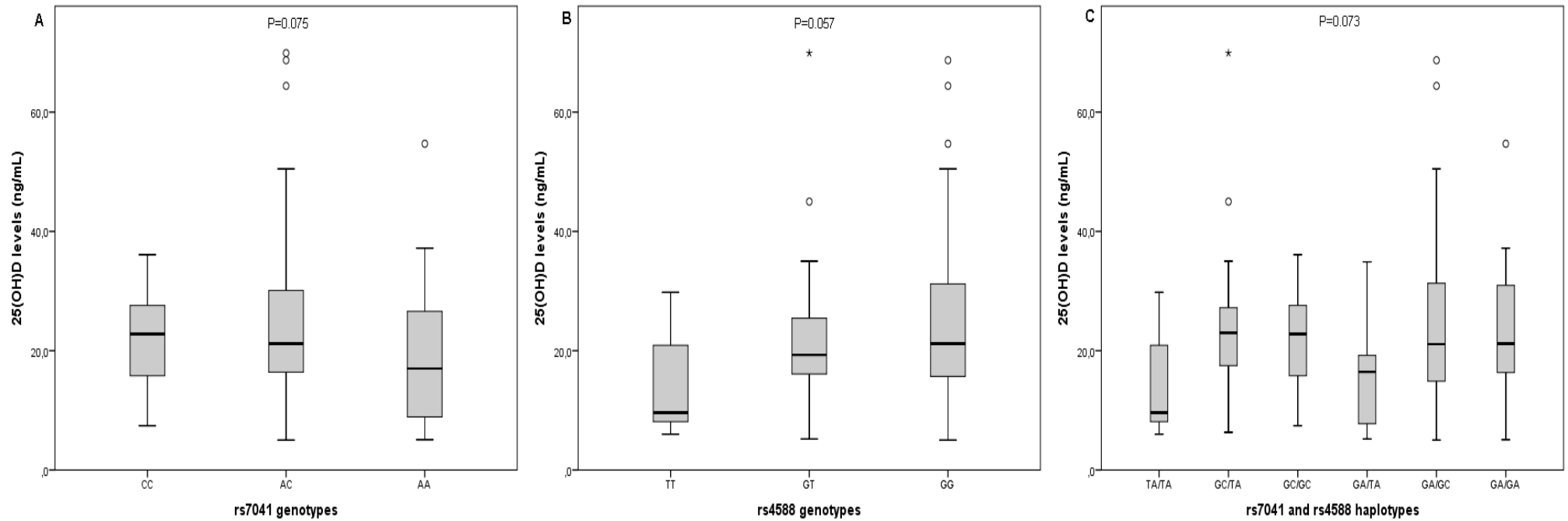


Figure 2. Box plots showing the distribution of 25(OH) D serum levels stratified according to (A) rs7041 genotypes, (B) rs4588 genotypes and (C) rs7041 and rs4588 haplotypes. Upper horizontal line of box, 75th percentile; lower horizontal line of box, 25th percentile; horizontal bar within box, median; upper horizontal bar outside box, 90th percentile; lower horizontal bar outside box, 10th percentile. Circles represent outliers. P values for Kruskal-Wallis test.

Table 1. Demographic, clinical and biochemical features of chronic hepatitis C genotype 1 patients.

Variable	Chronic hepatitis C genotype 1 (n=132)	
Sex (male) ^a	53.8% (71)	
Age (years) ^b	53 (±9)	
Body Mass Index (kg/m ²) ^b	28.5 (±5.2)	
ALT (IU/L) ^c	64 (42-100)	
AST(IU/L) ^c	53 (36-84)	
GGT(IU/L) ^c	90 (43-156)	
Platelets (10 ³ /μL) ^b	186 (±51)	
Cholesterol (mg/dL) ^c	164 (147-185)	
Glucose (mg/dL) ^c	100 (91-111)	
DM presence (yes) ^a	21.2% (28)	
METAVIR ^a	F0	12.9% (17)
	F1	22.7% (30)
	F2	18.9% (25)
	F3	12.1% (16)
	F4	33.3% (44)
Näive ^a	56.8% (75)	
25OH vitamin D (ng/mL) ^c	19.9 (14.0-29.4)	
Vitamin D status ^a	Severe deficiency	13.6% (18)
	Deficiency	36.4% (48)
	Insufficiency	27.3% (36)
	Sufficiency	22.7% (30)
Season of blood withdrawn	Summer/Autumn	25% (33)

DM- diabetes mellitus; a: % (n); b: mean (standard deviation); c: median (IQR P25-P75). Total sample for: BMI=125; platelets=131.

Table 2. Allelic, genotypic and haplotypic data of rs7041 and rs4588 polymorphisms in chronic hepatitis C genotype 1 patients.

Chronic hepatitis C genotype 1 (n=129)		
rs7041 ^a	C	46.1%
	CC	19.4% (25)
	AC	53.5% (69)
	AA	27.1% (35)
rs4588 ^a	T	21.3%
	TT	6.2% (8)
	GT	30.2% (39)
	GG	63.6% (82)
Haplotypes ^a	AT/AT	6.2% (8)
	AG/AT	9.3% (12)
	AG/AG	11.6 (15)
	CG/AT	20.9% (27)
	CG/CG	19.4% (25)
	AG/CG	32.6% (42)

a: % (n).

Table 3. Median 25 (OH)D stratified according to risky genotypes and haplotypes of rs7041 and rs4588.

		25(OH) D (ng/mL) *	P value
rs7041	CC + CA	22.8 (16.2- 30.1)	0.026
	AA	17.0 (8.9 – 26.6)	
rs4588	GG + GT	20.2 (15.8-29.8)	0.023
	TT	9.6 (8.1-20.9)	
Haplotypes	AT/AT + AG/AT	12.3 (8.1-19.2)	0.002
	AG/AG + CG/AT +CG/CG +AG/CG	21.2 (16.2-30.1)	

median (IQR P25-P75) Mann-Whitney

Table 4. Stepwise forward multiple linear regression analysis for variables associated with 25(OH)D serum levels.

Variables	β	SE	P value
Winter/Spring vs Summer/Autumn	-0.375	2.003	<0.001
Female sex	-0.261	1.740	0.001
Haplotypes AT/AT + AG/AT vs others	-0.259	1.254	0.001

Variables included in the model: sex, age, fibrosis (none/mild or severe), diabetes mellitus, BMI, ALT, AST, GGT, cholesterol, glucose, platelets, rs4588 and rs7041 haplotypes (AT/AT + AG/AT vs others), season of blood withdrawn (Summer/Autumn vs Winter/Spring). β : standardized coefficient beta; SE: standard error.

Table 5. Bivariate and logistic regression analysis of risk factors associated with severe fibrosis in chronic hepatitis C genotypes 1 patients.

	None/mild fibrosis n=72	Severe fibrosis n=60	Bivariate analysis P value	Logistic Regression	
				OR (CI 95%)	P value
Sex (male) ^a	54.2% (39)	53.3% (32)	1.000	-	-
Age (years) ^b	50.9 (±8.2)	55.6 (±8.6)	0.002	1.058 (1.001-1.117)	0.045
Body Mass Index (kg/m ²) ^c	27.6 (±4.3)	29.6 (±6.1)	0.042	1.142 (1.037-1.258)	0.007
ALT (IU/L) ^c	58 (41-92)	71 (47-105)	0.001	-	-
AST(IU/L) ^c	45 (34-76)	66 (48-98)	0.131	-	-
GGT(IU/L) ^c	64 (31-125)	117 (70-187)	0.001	-	-
Cholesterol (mg/dL) ^c	163 (147-186)	166 (147-177)	0.922	-	-
Glucose (mg/dL) ^c	96 (87-106)	102 (93-133)	<0.001	1.011 (0.999-1.023)	0.072
Platelets (10 ³ /μL) ^b	213 (±62)	155 (±68)	<0.001	0.985 (0.977-0.993)	<0.001
DM presence (yes) ^a	12.5% (9)	31.7% (19)	0.010	-	-
25OH vitamin D (ng/mL) ^c	21.1 (17.5-30.0)	18.1 (10.5-25.5)	0.014	-	-
25OH vitamin D <10 ng/mL ^a	5.6% (4)	23.3% (14)	0.004	4.558 (1.184-17.543)	0.027
25OH vitamin D <20 ng/mL ^a	43.1% (31)	58.3% (35)	0.115	-	-
25OH vitamin D <30 ng/mL ^a	75.0% (54)	80.0% (48)	0.537	-	-
rs7041 ^a	CC + CA	77.1% (54)	0.242	-	-
	AA	22.9% (16)			
rs4588 ^a	GG + GT	95.7% (67)	0.468	-	-
	TT	4.3% (3)			
Haplotypes ^a	AT/AT + AG/AT	12.9% (9)	0.465	-	-
	AG/AG + CG/AT +CG/CG +AG/CG	87.1% (61)			
		81.4% (48)			

Bivariate analysis: a: % (n) Fisher's Exact Test; b: mean (standard deviation) T test; c: median (IQR P25-P75) Mann-Whitney. Variables included in the stepwise logistic regression model with forward approach: sex, age, 25(OH)D >10ng/mL, season of blood withdrawn (summer/autumn vs winter/spring), diabetes mellitus, BMI, ALT, AST, GGT, cholesterol, glucose, platelets, rs4588 and rs7041 haplotypes (AT/AT + AG/AT vs others). OR: odds ratio; CI: confidence interval.

9 CAPÍTULO 2

Título: *Genetic variants underlying vitamin D metabolism and VDR-TGF β -1-SMAD3 interaction may impact on HCV progression. A study based on dbGaP data from the HALT-C study.*

Periódico: *Journal of Human Genetics*

ISSN: 1434-5161 (Print) 1435-232X (Online)

doi: JHG.2017.75

Página na internet: <https://www.nature.com/jhg/journal/vaop/ncurrent/full/jhg201775a.html>

Status: publicado online em 13 de julho 2017

Title Page

Genetic variants underlying vitamin D metabolism and VDR-TGF β -1-SMAD3 interaction may impact on HCV progression. A study based on dbGaP data from the HALT-C study.

Short title

Vitamin D genetic variants in HCV progression

Contributors

Laura A. de Azevedo¹, Ursula Matte^{2,3}, Themis R. da Silveira^{1,3}, Mário R. Álvares-da-Silva^{1,4}

1 Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

2 Department of Genetics; Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

3 Graduate Program in Child and Adolescence Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

4 Department of Internal Medicine, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Division of Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author:

Laura Alencastro de Azevedo

Avenida Ipiranga 2752, sala 303, Porto Alegre, Brazil.

+55 51 33085412

laura.alencastro@ufrgs.br

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the investigators and participants in the Hepatitis C Antiviral Long-term Treatment against Cirrhosis (HALT-C). The db-GaP project provided access to the datasets (dbGaP Study Accession: phs000430.v1.p1.). The authors thank Prof. Mara Hutz and Prof. Sidia Maria Callegari Jacques from the Genetics Department of Universidade Federal do Rio Grande do Sul for critical suggestions concerning the data analysis.

AUTHORS CONTRIBUTION

Study conception and design: UM; LAA. Performed the experiments: LAA. Analyzed the data: LAA. Wrote the paper: LAA; UM; TRS; MRAS. Critical revision: UM; TRS; MRAS.

Abstract

Vitamin D deficiency is prevalent in liver disease and vitamin D has been shown to decrease hepatic fibrosis through an anti-TGF β -1/SMAD3 effect mediated by the vitamin D receptor. Thus, we hypothesized that genetic variants involved in vitamin D metabolism and/or VDR/TGF β -1/SMAD3 interaction could impact on the progression of chronic HCV. We obtained or imputed genotypes for 40 single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in genes implicated in vitamin D metabolism from the HALT-C cohort via dbGaP. The HALT-C study followed 692 chronic HCV patients over 4 years, evaluating clinical outcomes including worsening of fibrosis, hepatic decompensation (gastric/esophageal bleeding, CTP > 7, ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and encephalopathy), development of hepatocellular carcinoma, and liver death. We tested the selected SNPs for association with these outcomes in 681 HALT-C subjects. Eleven SNPs presented tendency towards significance ($P < 0.05$): four SNPs in *DHCR7* related to with hepatic decompensation (rs4944957, rs12800438, rs3829251 and rs4945008); two in *GC* to worsening of fibrosis and liver death (rs7041 and rs222020); two in *CYP2R1* to ascites and hepatocellular carcinoma (rs7116978 and rs1562902); two in *VDR* to gastric/esophageal bleeding and hepatocellular carcinoma (rs4516035 and rs2239186); and one in *SMAD3* to worsening of fibrosis and encephalopathy (rs2118610). Only rs1800469 in *TGFB1* was statistically associated with hepatic decompensation after Bonferroni's correction ($P < 0.00125$). In conclusion, rs1800469 in *TGFB1* was associated to hepatic decompensation in chronic hepatitis C. The other eleven described polymorphisms must be evaluated in a larger cohort to determine the possible role of vitamin D in hepatitis C.

Keywords:

Vitamin D; HCV; HALT-C; db-GaP

INTRODUCTION

Chronic hepatitis C (CHC) leads to hepatic fibrosis, the liver's wound-healing response to injury.¹ Advanced liver fibrosis results in cirrhosis, which is characterized by distortion of the hepatic vasculature. The major consequences of cirrhosis in the natural course of CHC are impaired liver function, portal hypertension and an increased risk of developing hepatocellular carcinoma (HCC).^{2, 3} Given the high prevalence of vitamin D deficiency in CHC patients, the role of vitamin D in liver disease has received much attention over the past few years. Indeed, low levels of vitamin D have been found to be associated with a higher likelihood of advanced liver disease.⁴

The majority of vitamin D is synthesized in the skin as a result of exposure to UV radiation. In an initial step, 7-dehydrocholesterol is converted into pre-vitamin D by the 7-dehydrocholesterol reductase, followed by an isomerization step which completes the synthesis of vitamin D. A small proportion of vitamin D is obtained from the diet. Vitamin D from both skin conversion and dietary intake are hydroxylated in the liver by cytochrome P450 enzymes (CYP2R1). 25-hydroxyvitamin D (25-OH VD) circulates bound to vitamin D-binding protein (DBP), which is synthesized in the liver. The 1 α -hydroxylation of 25-OH VD by CYP27B1 in the kidney produces 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25-OH VD), the form that activates the vitamin D receptor (VDR). The enzyme CYP24A1 is responsible for catabolizing the excess of 1,25-OH VD. The VDR acts as a transcription factor that binds to vitamin D responsive elements in the promoter region of target genes,⁵ regulating the expression of more than 200 genes that influence cell proliferation, differentiation, apoptosis, immunomodulation, and angiogenesis.⁶

Among its many actions, it has been described that vitamin D decreases hepatic fibrosis by limiting hepatic stellate cell (HSC) activation through an anti-transforming growth factor beta 1 (TGF β -1) effect mediated by VDR.^{7, 8} Ding et al. found 10,436 genomic sites to be co-occupied by both VDR and SMAD3, an effector of TGF β -1 cascade, thus showing an interaction between the two transcription factors in HSCs.⁷ A common genetic variant of the *VDR* gene is the bAt haplotype, which is composed of three polymorphic sites (rs1544410 T/C, rs7975232 A/C, and rs731236 G/A).⁹ The bAt [CCA]-haplotype has been associated with fibrosis progression rates and cirrhosis.¹⁰ We thus hypothesized that genetic variants involved in vitamin D metabolism (*DHCR7*, *GC*, *CYP2R1*, *CYP27B1* and *CYP24A1*) and/or in the VDR-TGF β -1-SMAD3 interaction could impact on the evolution of chronic hepatitis C.

MATERIALS AND METHODS

Patient data

The present study is based on genotype and clinical phenotype data from the Hepatitis C Antiviral Long-term Treatment against Cirrhosis (HALT-C) Trial,¹¹ which we obtained from the Database of Genotypes and Phenotypes (db-GaP; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap>; accession number

phs000430.v1.p1)¹². Access to the controlled portion of the dbGaP data was granted by the NIH Data Access Committee. This study has also been approved by the Ethics Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

The HALT-C Trial is a randomized controlled trial designed to evaluate the safety and efficacy of long-term use of pegylated-interferon (PEG-IFN) for the treatment of chronic hepatitis C in patients who failed to respond to previous interferon therapy. HALT-C genotyping was funded through a Bench-to-Bedside Award (NIH) to Gonzalo Laje, MD in the Human Genetics Branch, Intramural Research Program, NIMH, NIH, U.S.DHHS. The original dataset, was submitted to dbGap by Dr Laje.

Information regarding inclusion and exclusion criteria and randomization can be found elsewhere.¹¹ Briefly, participants were adult CHC patients of any genotype who did not respond to previous interferon treatment, who had advanced fibrosis without hepatic decompensation or hepatocellular carcinoma, and who were free of any other liver diseases. A total of 692 subjects were randomized and followed over 4 years. A clinical and serological evaluation was carried out every 3 months; liver biopsies, endoscopic evaluation of esophageal varices and an assessment of portal hypertension were performed at the time of the enrollment and after 2 and 4 years. Information on the subjects' treatment status is not available through dbGaP. In this study, we evaluated the following outcomes:

- (A) Worsening of fibrosis, defined by a 2-point increase in Ishak Score for patients with an Ishak < 4;
- (B) Hepatic decompensation in cirrhotic patients (Ishak 5 or 6) who presented any of the following: bleeding from gastric or esophageal varices, Child-Turcotte-Pugh Score (CTP) > 7, ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatic encephalopathy;
- (C) Development of hepatocellular carcinoma;
- (D) Liver death: need for liver transplant and/or liver-related death.

Genetic Variant Selection

We selected, in the literature, 44 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of vitamin D metabolism (genes *DHCR7*, *GC*, *CYP2R1*, *CYP27B1*, *CYP24A1*) and VDR-TGF β -1-SMAD3 interaction that have been previously related to serum levels of vitamin D and/or to HCV progression for investigation in this cohort (Table 1).

Genotype Analysis and Imputation

Although HALT-C data included genotypes at 617,431 polymorphisms from the Illumina Human610_QuadV1_B platform, we were only interested in analyzing the 44 SNPs described in Table 1. Binary pedigree format files were obtained from db-GaP and handled with PLINK v.1.07³⁷. All markers were flipped to forward strand orientation, and ambiguous variants (A/T or C/G) were removed. Individuals with sex chromosome abnormalities and sex inconsistencies, as well as individuals with less than 90% genotype data were removed from the data set. SNPs with a genotype

call rate < 97% or a minor allele frequency (MAF) < 0.01, and SNPs deviating from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 10^{-6}$) were also excluded.

Genotypes were available for 21 of the 44 SNPs listed in Table 1. Genotypes for the remaining 23 were imputed using MaCH-Admix v. 2.0.203³⁸ in the integrated running mode. As a reference panel, we used a 1000 Genomes vcf file (ALL Phase 3 v.5), containing the haplotypes of 2,504 samples for approximately 81.2M polymorphic markers.³⁹ To speed up the computation, genotypes were imputed one chromosome at a time only for chromosomes of interest (4, 11, 12, 15, 19, and 20), and the reference panel was split in chunks of 5Mb centered around the SNP of interest, with flanks of 250kb on either side. Imputation running settings included: --states 200, --imputestates 1000, and --rounds 50. At the end of each run, imputed genotypes were extracted with fcGENE 1.0.7⁴⁰ in binary pedigree format. The imputation quality was measured by the squared correlation between imputed and true genotypes (Rs_q). Variants with an Rs_q > 0.5 were considered as successfully imputed.⁴¹ SNPs with a lower Rs_q were excluded from the analysis.

Statistical Analysis

For each of the four outcomes, a logistic regression analysis was conducted to evaluate the association with the 44 SNPs of interest. The five signs of hepatic decompensation - bleeding of gastric or esophageal varices, CTP score > 7, ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatic encephalopathy - were analyzed separately by logistic regression, and were considered secondary outcomes. Logistic regression analyses were adjusted for age, sex, and race (as a dummy variable - white and non-white) after checking in single regression analysis if these variables were associated with the studied polymorphisms. Analyses were carried out to test for dominant (minor-minor or minor-major vs. major-major), recessive (minor-minor vs. minor-major or major-major), and additive models of inheritance. We regard this as an exploratory study; therefore, SNPs reaching the $P < 0.05$ threshold were considered as showing "*tendency towards association*". Subsequently, Bonferroni's correction was conducted to adjust for multiple comparisons ($P < 0.05$ / number of evaluated SNPs in the analyses). Statistical analysis was performed using PLINK. The VDR bAt [CCA]-haplotype was evaluated using MaCH-Admix and Haploview v 4.2⁴², and Chi-square tests were performed in SPSS 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

RESULTS

After applying quality control filters, 681 individuals were retained. 550,275 SNPs were used for imputation (Figure 1). Four SNPs were removed from the final analyses due to low quality imputation ($rsq < 0.5$) (Supplementary Table 1), making for a total of 40 SNPs (21 genotyped, 19 imputed). Level of significance after Bonferroni correction was set at 0.00125 ($P < 0.05/40$).

Demographic and clinical data of analyzed patients are summarized in Table 2. The majority of patients were male (71.4%) and white (72.4%). Mean age at enrolment was 49.9 years, ranging from

19 to 80 years. Some of the studied SNPs presented association with studied available covariates (sex, age and race) in single regression analysis (Supplementary Table 2).

For the analysis of worsening fibrosis, a total of 366 patients with baseline Ishak ≤ 4 and at least two liver biopsies to evaluate progression were included (Figure 2). One hundred patients had a minimum 2-point increase in Ishak score during the four-year follow-up. The results of the logistic regression analysis for worsening fibrosis are described in Table 3. Two SNPs in the *GC* gene, rs7041 and rs222020, as well as one SNP in *SMAD3*, rs2118610, presented only tendency towards association under additive and dominant models. Since the *VDR* bAt [CCA]-haplotype (rs1544410, rs7975232, and rs731236) has been associated with a worsening of fibrosis, it was analyzed separately. Haplotype frequencies were: 0.468 for CCA; 0.354 for TAG; 0.153 for CAA; and 0.013 for TAA. Haplotype frequencies did not differ between patients who had an increase of at least 2 point in their Ishak score and those who did not. Homozygosity at the bAt [CCA] haplotype versus all other genotypes was not found to be associated to a worsening of fibrosis [23% (23/100) vs. 20.7% (55/266); $P=0.363$].

One-hundred and twenty-six of the 393 cirrhotic patients presented at least one of the following: bleeding from gastric or esophageal varices, ascites, spontaneous bacterial peritonitis, hepatic encephalopathy and/or CTP Score > 7 . The latter was the most frequent sign, present in 105 patients (Table 2). In the regression analysis for hepatic decompensation, 4 polymorphisms in the *DHCR7* gene (rs4944957, rs12800438, rs3829251 and rs4945008) showed tendency towards significance, and only rs1800469 in *TGFB1* was significant after Bonferroni's correction (Table 4). When each one of the five decompensation variables were analyzed separately, six SNPs demonstrate tendency towards significance, including rs1800469 in *TGFB1* with CTP > 7 , but none of these were associated after Bonferroni's correction (Table 4).

After 4 years of follow-up, 55 patients had developed HCC. In the logistic regression analysis of HCC, two polymorphisms showed tendency towards significance under the recessive model, rs1562902 in *CYP2R1* and rs2239186 in *VDR* (Table 5). The overall mortality over the course of the study was of 94 patients (13.8%). Fifty-two of those deaths were liver related. Ninety-nine patients needed a transplant and/or progressed to a liver related death. The polymorphism rs7041 showed tendency towards significance for this outcome under the recessive model of inheritance (Table 5).

A summary of SNPs reaching tendency towards significance or significance after Bonferroni's correction for any given outcome can be found in Table 6. Risk alleles found at rs1800469 for hepatic decompensation, rs4516035 for gastric esophageal bleeding and rs3829251 for hepatic decompensation were in accordance with risk alleles reported in the literature.

Results under the additive model for all 40 SNPs for worsening of fibrosis, hepatic decompensation, HCC and liver death are presented in Supplementary Table 3.

DISCUSSION

The high prevalence of vitamin D deficiency is independent of the etiology of liver disease and may impact upon clinical outcomes.⁴³ Polymorphisms in *GC*, *CYP2R1* and *CYP27B1* could play a role in treatment response to PEG-IFN and ribavirin,⁴⁴ although baseline levels of 25-OH VD do not seem to.⁴⁵ With this in mind, we hypothesized that genetic variants involved in vitamin D metabolism could impact on the progression of liver disease in outcomes such as worsening of fibrosis, hepatic, development of HCC and liver death. SNPs in *DHCR7*, *GC* and *CYP* genes are mostly related to vitamin D synthesis and can influence its circulating levels. In addition, variants involved in the VDR/TGF β -1/SMAD3 signaling cascade could have an effect on fibrosis and other liver-related events.

We tested our hypothesis on data collected by the HALT-C trial, which evaluated the efficacy of long-term use of pegylated interferon for preventing progression of CHC. We selected 42 SNPs that had previously been reported to be related to progression of HCV-chronic liver disease and two SNPs related to scarring (both in *SMAD3*). After discarding four SNPs due to insufficient imputation quality scores, twelve of these SNPs were found to be associated or with tendency towards association with at least one of the studied outcomes.

Four SNPs in the *DHCR7* gene presented tendency towards significance with hepatic decompensation and/or gastric/esophageal bleeding. Although these findings indicate only a tendency, the A allele of rs3829251, related to presence of hepatic decompensation, has previously been reported to be associated to lower levels of circulating vitamin D.^{15, 16, 19} The other three SNPs were linked to serum levels of vitamin D in a single GWAS study, which did, however, not report risk alleles.¹³

In the *GC* gene two polymorphisms showed tendency towards significance with worsening of fibrosis or liver death. SNP rs7041 is one of the two most common polymorphisms of the *GC* gene, leading to an amino acid change⁴⁶ and to lower serum levels of vitamin D.^{13, 15} However, the A allele identified in this study as “risk”, was reported to be responsible for higher levels of vitamin D in the literature. For rs222020, an intron variant of *GC*, that also showed tendency to significance, has been described both as a protective and as a risk factor for vitamin D levels in Caucasians.^{20, 21}

At the *CYP2R1* locus, two SNPs showed tendency towards significance to ascites and to hepatocellular carcinoma. While we found the T allele at rs7116978 to be weakly related with ascites, it has been reported to be associated to higher vitamin D serum levels.²⁶ We found that the homozygosity for the C allele of the polymorphism rs1562902, tended towards significance with the development of hepatocellular carcinoma. In previous studies, the C allele has been related to both risk of and protection from low levels of vitamin D.^{20, 23, 47} We described various SNPs in *DHCR7*, *GC* and *CYP2R1* genes with tendency towards significance with the studied outcomes, however our results were controversial or did not corroborate the literature.

The interaction between VDR, TGF β -1 and SMAD3 needs to be considered more directly in the context of liver fibrosis and the progression of liver disease following it. Though we only found polymorphisms with tendency towards significance in *VDR*, those findings are in accordance to which is described in the literature. The C allele of rs4516035, related in this sample to gastric/esophageal bleeding, was described to be related to an increased expression of TGF β -1 and α -SMA mRNA in the liver of patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.⁸ Also, the G allele of rs2239186, related to HCC in this sample, has been described to be linked to both lower and higher levels of vitamin D.^{23, 31} We expected to find an association between SNPs at the *VDR* locus and worsening fibrosis in this cohort; however, none of the SNPs in the *VDR* gene were significant for liver fibrosis, and neither was the bAt [CCA] haplotype. This may be due to the fact that the differences in CCA haplotype frequencies found by Baur et al.¹⁰ were caused mainly by rs7975232, which was not significant in our sample. In our study, *SMAD3* gene demonstrated controversial findings; T allele of rs2118610 tended towards significance with progression of liver fibrosis, and C allele to presence of hepatic encephalopathy. Although we have not found any association of this polymorphism with liver disease in the literature, Brown et al. found that the C allele might play a role in keloid formation in Afro-Caribbeans.³² In this cohort, the AA genotype of rs1800469 in the *TGFB1* gene was the only one with statistical association after Bonferroni's correction, being associated with hepatic decompensation. Transforming growth factor beta plays a central role in many fibrotic diseases, including chronic hepatitis, and TGF- β signaling in these processes has been attributed to a canonical pathway involving Smad proteins.⁴⁸ The A allele of rs1800469 has been linked to both increased levels of TGF- β 1 and risk of cirrhosis,³⁰ as well as related to the development of HCC in Chinese and Egyptian patients.^{35, 36} Therefore, we believe our results and the ones reported in Chinese and Egyptians populations lean toward the same direction, since HCC is the natural evolution of cirrhosis. Maybe a follow-up period of four years may not be sufficient to HCC development. On the other hand, these associations may be population-specific and it is possible that Egyptians and Chinese are not comparable to the American population analyzed in the HALT-C Cohort. We should keep in mind that the association found here between rs1800469 and hepatic decompensation may be only a result of the severity of cirrhosis rather than being related to vitamin D pathway itself.

Low levels of vitamin D have been linked to increased mortality among cirrhotic patients.⁴⁹ None of the studied polymorphisms were related to liver transplant and/or death. *VDR* polymorphisms have been associated to acute cellular rejection in liver-transplanted patients.⁵⁰ However, there was no information on post-transplant events among the available clinical HALT-C data.

Our study has potential limitations. Vitamin D serum levels were not available to confirm the relationship between polymorphisms and variants. Corey et al. published an ancillary study on vitamin D serum levels in 129 cases and 129 controls of the HALT-C cohort.⁵¹ They defined as cases those patients who experienced an increase of at least 2 points in their Ishak fibrosis score or who developed hepatic decompensation over the course of the study. The controls were subjects with stage 3 or 4 fibrosis who did not reach any of these endpoints. In comparative analyses, mean 25-OH

VD measures did not differ between groups. This shows that analyses of associations between punctual 25-OH VD serum levels and hard outcomes can be misleading, since 25-OH VD serum levels fluctuate as a consequence of seasons, age, race, gender, among other factors.

The original HALT-C study tested whether PEG-INF treatment had an effect on disease progression. The participants' treatment status could represent a potential confounder for the present study, and we did not have access to this information. However, since the HALT-C study did not find any association between PEG-INF treatment and disease progression, we believe that our results are robust.⁵² Also, no information regarding viral factors were available, such as viral load and genotype. However we do know that the great majority of enrolled patients were genotype 1, as described by Di Bisceglie.⁵²

Even though the existence of other polymorphisms, either in the genes studied here or in other genes related to vitamin D metabolism, cannot be ruled out, we consider it a strength of our study that we included only the SNPs most likely to be associated with vitamin D metabolism in liver disease progression. We view our results as exploratory, pending further confirmation on an independent cohort to validate our findings. We decided to present SNPs reaching a 0.05 threshold, since corrections for multiple testing could be too stringent, risking the suppression of interesting findings.⁵³⁻

⁵⁵ However, multiple measurements may incur a risk for type I errors and these results should be looked at with care. Of the 40 analyzed SNPs, eleven presented tendency towards significance, reaching a 0.05 threshold, while only rs1800469 in *TGFB1* was significant after Bonferroni correction. Also, it is worth noting that the effective sample size was relatively small for all outcomes (Figure 2). It is well established that the sample size is one of the most important factors affecting the power of genetic association studies for complex phenotypes.⁵⁶ The fact that weak association signals could be detected in this relatively small sample therefore suggests that these SNPs are worth investigating in larger cohorts.

In conclusion, polymorphisms underlying vitamin D metabolism and effects showed a possible association with important outcomes in chronic hepatitis C. Here, we reported eleven polymorphisms that must be confirmed in a larger cohort and that could potentially be used in further studies to evaluate the role of vitamin D in chronic hepatitis C; and one polymorphism in *TGFB1* gene that was associated to hepatic decompensation in these patients.

REFERENCES

1. Hernandez-Gea V., Friedman S.L. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu Rev Pathol-Mech.* 6, 425-456 (2011).
2. Schuppan D., Afdhal N.H. Liver cirrhosis. *Lancet.* 371, 838-851 (2008).
3. Westbrook R.H., Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol.* 61, S58-S68 (2014).
4. Garcia-Alvarez M., Pineda-Tenor D., Jimenez-Sousa M.A., Fernandez-Rodriguez A., Guzman-Fulgencio M., Resino S. Relationship of vitamin D status with advanced liver fibrosis and response to hepatitis C virus therapy: a meta-analysis. *Hepatology.* 60, 1541-1550 (2014).
5. Stokes C.S., Volmer D.A., Grunhage F., Lammert F. Vitamin D in chronic liver disease. *Liver Int.* 33, 338-352 (2013).
6. Holick M.F. Vitamin D deficiency. *New Engl J Med.* 357, 266-281 (2007).

7. Ding N., Yu R.T., Subramaniam N., Sherman M.H., Wilson C., Rao R., et al. A Vitamin D Receptor/SMAD Genomic Circuit Gates Hepatic Fibrotic Response. *Cell*. 153, 601-613 (2013).
8. Beilfuss A., Sowa J.P., Sydor S., Beste M., Bechmann L.P., Schlattjan M., et al. Vitamin D counteracts fibrogenic TGF-beta signalling in human hepatic stellate cells both receptor-dependently and independently. *Gut*. 64, 791-799 (2015).
9. Uitterlinden A.G., Fang Y., van Meurs J.B.J., Pols H.A.P., van Leeuwen J.P.T.M. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 338, 143-156 (2004).
10. Baur K., Mertens J.C., Schmitt J., Iwata R., Stieger B., Eloranta J.J., et al. Combined effect of 25-OH vitamin D plasma levels and genetic Vitamin D Receptor (NR 11) variants on fibrosis progression rate in HCV patients. *Liver International*. 32, 635-643 (2012).
11. Lee W.M., Dienstag J.L., Lindsay K.L., Lok A.S., Bonkovsky H.L., Shiffman M.L., et al. Evolution of the HALT-C trial: pegylated interferon as maintenance therapy for chronic hepatitis C in previous interferon nonresponders. *Controlled clinical trials*. 25, 472-492 (2004).
12. Mailman M.D., Feolo M., Jin Y., Kimura M., Tryka K., Bagoutdinov R., et al. The NCBI dbGaP database of genotypes and phenotypes. *Nat Genet*. 39, 1181-1186 (2007).
13. Wang T.J., Zhang F., Richards J.B., Kestenbaum B., van Meurs J.B., Berry D., et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet*. 376, 180-188 (2010).
14. Batai K., Murphy A.B., Shah E., Ruden M., Newsome J., Agate S., et al. Common vitamin D pathway gene variants reveal contrasting effects on serum vitamin D levels in African Americans and European Americans. *Hum Genet*. 133, 1395-1405 (2014).
15. Ahn J., Yu K., Stolzenberg-Solomon R., Simon K.C., McCullough M.L., Gallicchio L., et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet*. 19, 2739-2745 (2010).
16. Lu L., Sheng H.G., Li H.X., Gan W., Liu C., Zhu J.W., et al. Associations between common variants in GC and DHCR7/NADSYN1 and vitamin D concentration in Chinese Hans. *Hum Genet*. 131, 505-512 (2012).
17. Signorello L.B., Shi J.J., Cai Q.Y., Zheng W., Williams S.M., Long J.R., et al. Common Variation in Vitamin D Pathway Genes Predicts Circulating 25-Hydroxyvitamin D Levels among African Americans. *Plos One*. 6, (2011).
18. Lange C.M., Miki D., Ochi H., Nischalke H.D., Bojunga J., Bibert S., et al. Genetic Analyses Reveal a Role for Vitamin D Insufficiency in HCV-Associated Hepatocellular Carcinoma Development. *Plos One*. 8, (2013).
19. Kuhn T., Kaaks R., Teucher B., Hirche F., Dierkes J., Weikert C., et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and its genetic determinants in relation to incident myocardial infarction and stroke in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)-Germany study. *PLoS One*. 8, e69080 (2013).
20. Bu F.X., Armas L., Lappe J., Zhou Y., Gao G.M., Wang H.W., et al. Comprehensive association analysis of nine candidate genes with serum 25-hydroxy vitamin D levels among healthy Caucasian subjects. *Hum Genet*. 128, 549-556 (2010).
21. Porter T.R., Li X., Stephensen C.B., Mulligan K., Rutledge B., Flynn P.M., et al. Genetic associations with 25-hydroxyvitamin D deficiency in HIV-1-infected youth: fine-mapping for the GC/DBP gene that encodes the vitamin D-binding protein. *Frontiers in genetics*. 4, 234 (2013).
22. Xu W., Sun J., Wang W., Wang X., Jiang Y., Huang W., et al. Association of genetic variants of vit D binding protein (DBP/GC) and of the enzyme catalyzing its 25-hydroxylation (DCYP2R1) and serum vit D in postmenopausal women. *Hormones (Athens)*. 13, 345-352 (2014).
23. Wjst M., Altmuller J., Faus-Kessler T., Braig C., Bahnweg M., Andre E. Asthma families show transmission disequilibrium of gene variants in the vitamin D metabolism and signalling pathway. *Respiratory research*. 7, 60 (2006).
24. Grunhage F., Hochrath K., Krawczyk M., Hoblinger A., Obermayer-Pietsch B., Geisel J., et al. Common genetic variation in vitamin D metabolism is associated with liver stiffness. *Hepatology*. 56, 1883-1891 (2012).
25. Petta S., Grimaudo S., Marco V.D., Scazzone C., Macaluso F.S., Camma C., et al. Association of vitamin D serum levels and its common genetic determinants, with severity of liver fibrosis in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepatitis*. 20, 486-493 (2013).
26. Nissen J., Rasmussen L.B., Ravn-Haren G., Andersen E.W., Hansen B., Andersen R., et al. Common variants in CYP2R1 and GC genes predict vitamin D concentrations in healthy Danish children and adults. *Plos One*. 9, e89907 (2014).

27. Ramos-Lopez E., Kahles H., Weber S., Kukic A., Penna-Martinez M., Badenhop K., et al. Gestational diabetes mellitus and vitamin D deficiency: genetic contribution of CYP27B1 and CYP2R1 polymorphisms. *Diabetes Obes Metab.* 10, 683-U682 (2008).
28. Falletti E., Bitetto D., Fabris C., Cussigh A., Fontanini E., Fornasiere E., et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. *World J Gastroentero.* 16, 3016-3024 (2010).
29. Hung C.H., Chiu Y.C., Hu T.H., Chen C.H., Lu S.N., Huang C.M., et al. Significance of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms for Risk of Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C. *Transl Oncol.* 7, 503-507 (2014).
30. Mohy A., Fouad A. Role of transforming growth factor-beta1 in serum and - 509 C>T promoter gene polymorphism in development of liver cirrhosis in Egyptian patients. *Meta gene.* 2, 631-637 (2014).
31. Yao S., Zirpoli G., Bovbjerg D.H., Jandorf L., Hong C.C., Zhao H., et al. Variants in the vitamin D pathway, serum levels of vitamin D, and estrogen receptor negative breast cancer among African-American women: a case-control study. *Breast cancer research : BCR.* 14, R58 (2012).
32. Brown J.J., Ollier W., Arscott G., Ke X., Lamb J., Day P., et al. Genetic susceptibility to keloid scarring: SMAD gene SNP frequencies in Afro-Caribbeans. *Experimental dermatology.* 17, 610-613 (2008).
33. Sanchez-Parada M.G., Alvarez-Rodriguez B.A., Gomez-Meda B.C., Troyo-Sanroman R., Sanchez-Orozco L.V., Zamora-Perez A.L., et al. Association of genetic polymorphisms with histological grading of necroinflammation, staging of fibrosis, and liver function in Mexicans with chronic hepatitis C virus infection. *J Investig Med.* 61, 1088-1096 (2013).
34. Eurich D., Bahra M., Boas-Knoop S., Lock J.F., Golembus J., Neuhaus R., et al. Transforming growth factor beta1 polymorphisms and progression of graft fibrosis after liver transplantation for hepatitis C virus--induced liver disease. *Liver Transpl.* 17, 279-288 (2011).
35. Ma J., Liu Y.C., Fang Y., Cao Y., Liu Z.L. TGF-beta1 polymorphism 509 C>T is associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients. *Genetics and molecular research : GMR.* 14, 4461-4468 (2015).
36. Radwan M.I., Pasha H.F., Mohamed R.H., Hussien H.I., El-Khshab M.N. Influence of transforming growth factor-beta1 and tumor necrosis factor-alpha genes polymorphisms on the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients. *Cytokine.* 60, 271-276 (2012).
37. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A.R., Bender D., et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics.* 81, 559-575 (2007).
38. Liu E.Y., Li M., Wang W., Li Y. MaCH-admix: genotype imputation for admixed populations. *Genet Epidemiol.* 37, 25-37 (2013).
39. Abecasis G.R., Auton A., Brooks L.D., DePristo M.A., Durbin R.M., Handsaker R.E., et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature.* 491, 56-65 (2012).
40. Roslyara N.R., Scholz M. fcGENE: a versatile tool for processing and transforming SNP datasets. *PLoS One.* 9, e97589 (2014).
41. Porcu E., Sanna S., Fuchsberger C., Fritsche L.G. Genotype imputation in genome-wide association studies. *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.]. Chapter 1, Unit 1 25* (2013).
42. Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 21, 263-265 (2005).
43. Kitson M.T., Roberts S.K. D-livering the message: The importance of vitamin D status in chronic liver disease. *J Hepatol.* 57, 897-909 (2012).
44. Falletti E., Cmet S., Fabris C., Fattovich G., Cussigh A., Bitetto D., et al. Genetic Polymorphisms of Vitamin D Pathway Predict Antiviral Treatment Outcome in Slow Responder Naive Patients with Chronic Hepatitis C. *Plos One.* 8, (2013).
45. Kitson M.T., Sarrazin C., Toniutto P., Eslick G.D., Roberts S.K. Vitamin D level and sustained virologic response to interferon-based antiviral therapy in chronic hepatitis C: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 61, 1247-1252 (2014).
46. Santos B.R., Mascarenhas L.P.G., Boguszewski M.C.S., Spritzer P.M. Variations in the Vitamin D-Binding Protein (DBP) Gene Are Related to Lower 25-Hydroxyvitamin D Levels in Healthy Girls: A Cross-Sectional Study. *Hormone research in paediatrics.* 79, 162-168 (2013).

47. Zhang Y., Wang X., Liu Y., Qu H., Qu S., Wang W., et al. The GC, CYP2R1 and DHCR7 genes are associated with vitamin D levels in northeastern Han Chinese children. *Swiss Med Wkly.* 142, w13636 (2012).
48. Wobke T.K., Sorg B.L., Steinhilber D. Vitamin D in inflammatory diseases. *Frontiers in physiology.* 5, 244 (2014).
49. Stokes C.S., Krawczyk M., Reichel C., Lammert F., Grunhage F. Vitamin D deficiency is associated with mortality in patients with advanced liver cirrhosis. *Eur J Clin Invest.* 44, 176-183 (2014).
50. Falletti E., Bitetto D., Fabris C., Cmet S., Fornasiere E., Cussigh A., et al. Association between vitamin D receptor genetic polymorphisms and acute cellular rejection in liver-transplanted patients. *Transpl Int.* 25, 314-322 (2012).
51. Corey K.E., Zheng H., Mendez-Navarro J., Delgado-Borrego A., Dienstag J.L., Chung R.T. Serum vitamin D levels are not predictive of the progression of chronic liver disease in hepatitis C patients with advanced fibrosis. *PLoS One.* 7, e27144 (2012).
52. Di Bisceglie A.M., Shiffman M.L., Everson G.T., Lindsay K.L., Everhart J.E., Wright E.C., et al. Prolonged Therapy of Advanced Chronic Hepatitis C with Low-Dose Peginterferon. *New Engl J Med.* 359, 2429-2441 (2008).
53. Armstrong R.A. When to use the Bonferroni correction. *Ophthalmic Physiol Opt.* 34, 502-508 (2014).
54. Perneger T.V. What's wrong with Bonferroni adjustments. *BMJ.* 316, 1236-1238 (1998).
55. Rothman K.J. No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology.* 1, 43-46 (1990).
56. Sham P.C., Purcell S.M. Statistical power and significance testing in large-scale genetic studies. *Nature reviews. Genetics.* 15, 335-346 (2014).

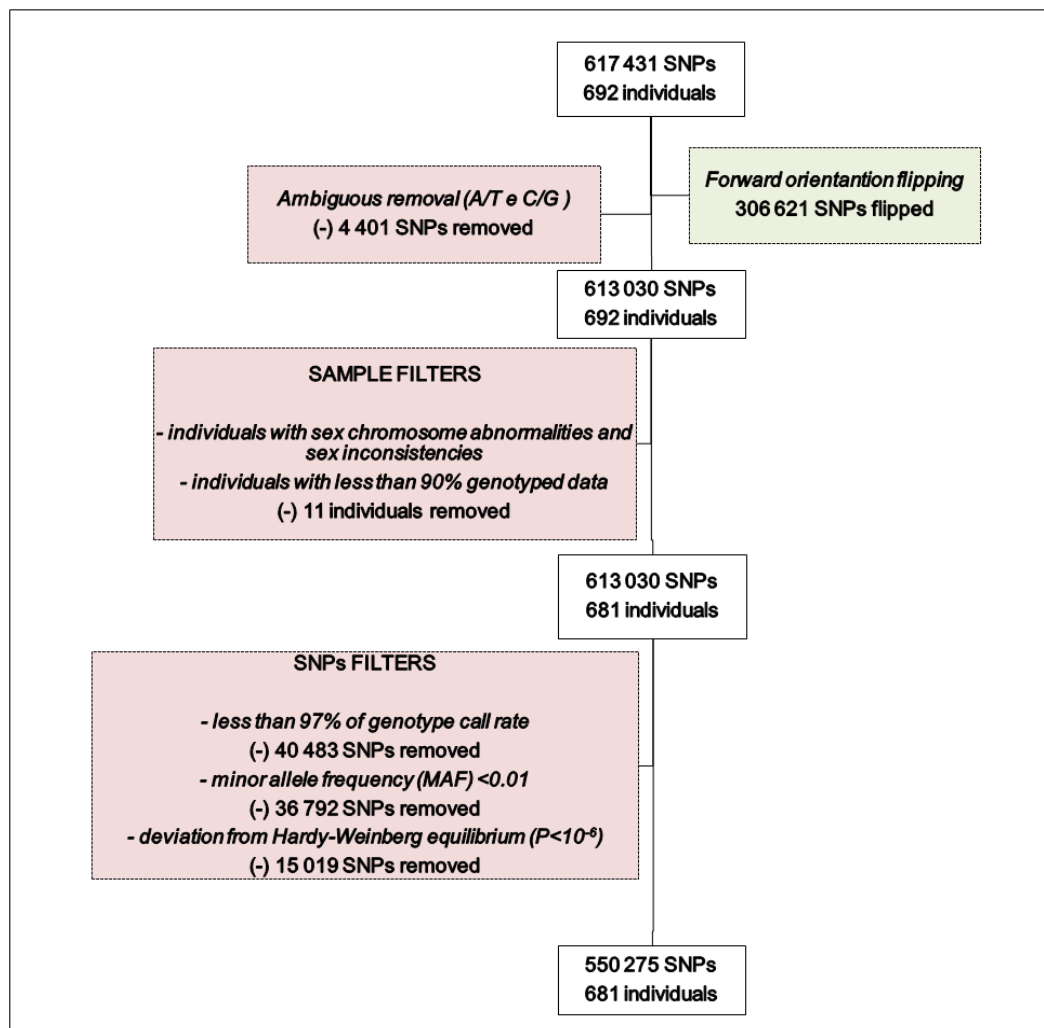


Figure 1: Summary of the quality control procedure, including numbers of individuals and SNPs removed.

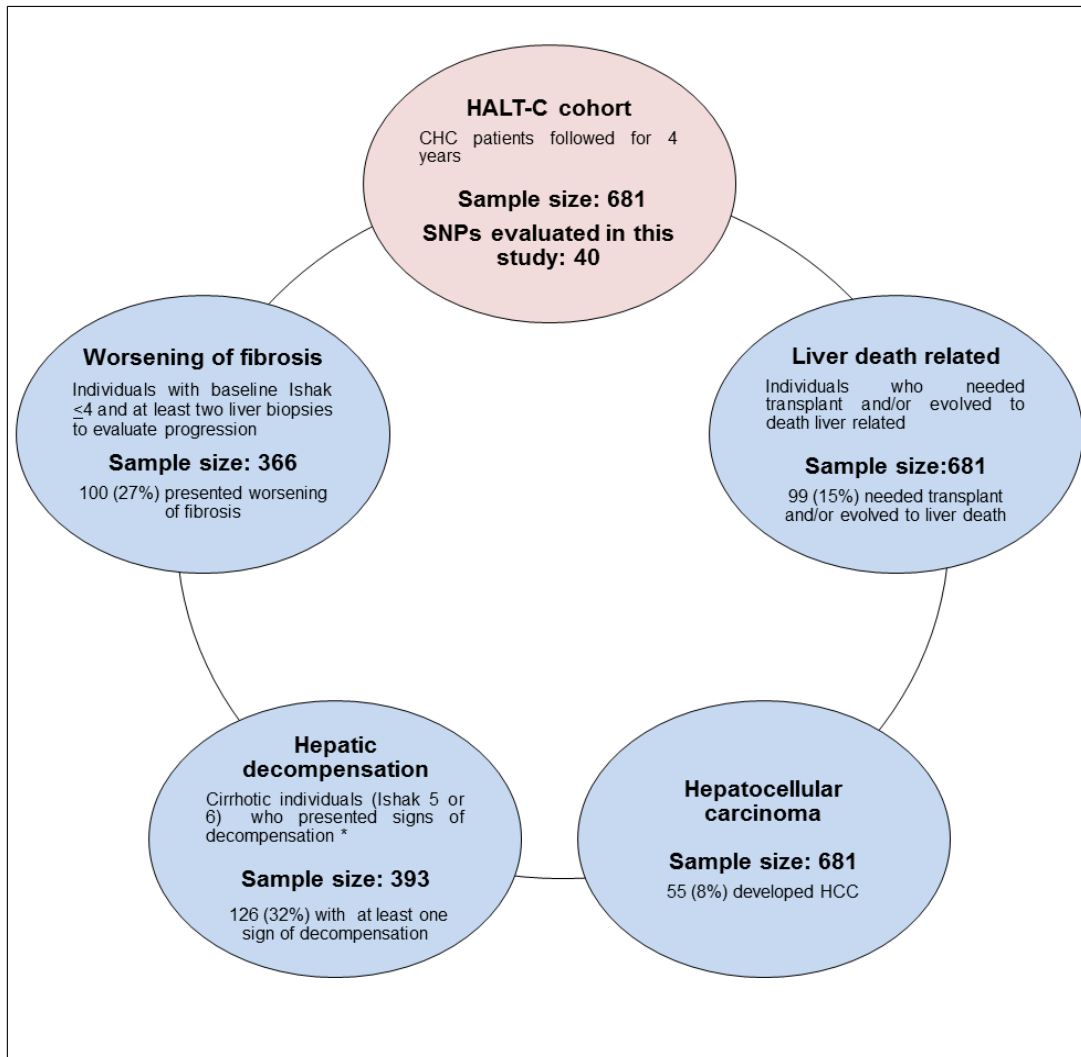


Figure 2: Sample size for each of the analyzed outcomes. *Signs of hepatic decompensation: bleeding of gastric or esophageal varices, Child-Turcotte-Pugh Score >7 , ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatic encephalopathy.

Table 1. Polymorphisms of vitamin D metabolism related to serum levels of vitamin and/or CHC progression selected from the literature.

Chr	Gene	Protein	dbSNP	Alleles	Position (bp)	Reported association	Citation
4	GC	DBP	rs17467825	A/G	72605517	Vitamin D serum levels	13, 14
			rs2282679	T/G	72608383	Vitamin D serum levels, HCC	13-19
			rs3755967	T/C	72609398	Vitamin D serum levels	13, 14
			rs2298850	C/G	72614267	Vitamin D serum levels	13, 14
			rs4588	T/G	72618323	Vitamin D serum levels	13, 16
			rs7041	C/A	72618334	Vitamin D serum levels	13-16
			rs222020	C/T	72636272	Vitamin D serum levels	20-22
			rs1155563	C/T	72643488	Vitamin D serum levels	13-16, 19
			rs2298849	G/A	72648851	Vitamin D serum levels	17, 20
			rs115316390	A/G	72651159	Vitamin D serum levels	14
			rs221999	G/A	72649048	Vitamin D serum levels	23
11	DHCR7	DHCR7	rs1790349	T/C	71142350	Vitamin D serum levels	15, 16
			rs7944926	A/G	71165625	Vitamin D serum levels	13
			rs12785878	G/T	71167449	Vitamin D serum levels, Liver fibrosis	13, 19, 24, 25
			rs4944957	A/G	71168035	Vitamin D serum levels	13
			rs12800438	A/G	71171003	Vitamin D serum levels	13
			rs3794060	C/T	71187679	Vitamin D serum levels	13
			rs3829251	A/G	71194559	Vitamin D serum levels	15, 16, 19
			rs4945008	A/G	71221248	Vitamin D serum levels	13
			rs11234027	A/G	71234107	Vitamin D serum levels	15
			11	CYP2R1	CYP2R1	rs7116978	C/T
rs1993116	G/A	14910234				Vitamin D serum levels, HCC	13-15, 18
rs10500804	G/T	14910273				Vitamin D serum levels	13
rs12794714	A/G	14913575				Vitamin D serum levels	13, 14, 20
rs10741657	A/G	14914878				Vitamin D serum levels	13, 14, 20, 27
rs2060793	A/G	14915310				Vitamin D serum levels	13-16
rs1562902	C/T	14918216				Vitamin D serum levels	20, 23
rs10766197	A/G	14921880				Vitamin D serum levels	20, 23
12	CYP27B1	CYP27B1	rs10877012	G/T	58162085	Vitamin D serum levels	17, 27
12	VDR	VDR	rs731236	G/A	48238757	Liver fibrosis, HCC	8, 10, 28
			rs7975232	A/C	48238837	Liver fibrosis, HCC	8, 10, 28, 29
			rs757343	T/C	48239675	Liver fibrosis	8, 30
			rs1544410	T/C	48239835	Liver fibrosis, HCC	8, 10, 28
			rs2239186	G/A	48269410	Vitamin D serum levels	23, 31
			rs4516035	C/T	48299826	Liver fibrosis	8
15	SMAD3	SMAD3	rs9806504	C/T	67392777	Skin fibrosis (keloid)	32
			rs11071932	A/G	67399546	Skin fibrosis (keloid)	32
			rs2118610	T/C	67428334	Skin fibrosis (keloid)	32
19	TGFB1	TGFβ-1	rs1800471	C/G	41858876	Liver fibrosis	33, 34
			rs1800469	G/A	41860296	Cirrhosis, HCC	35, 36
20	CYP24A1	CYP24A1	rs2296241	A/G	52786219	Vitamin D serum levels	23
			rs17219315	A/G	52788446	Vitamin D serum levels	23
			rs73913757	C/T	52790518	Vitamin D serum levels	14
			rs2244719	C/T	52782858	Vitamin D serum levels	23

Table 2: Demographic and clinical features of chronic hepatitis C patients.

Variable	Chronic hepatitis C (n=681)
Sex (male) ^a	486 (71.4%)
Age (years) ^b	49.9 (±7)
Ethnicity ^a	
White	493 (72.4%)
Black	117 (17.2%)
Hispanic	55 (8.1%)
Other	16 (2.3%)
Baseline Ishak score ^a	
2	47 (6.9%)
3	233 (34.2%)
4	124 (18.2%)
5	150 (22.0%)
6	127 (18.6%)
Cirrhosis decompensation	126 / 393 (32.1%)
Gastric/esophageal bleeding ^c	10 (2.7%)
CTP > 7	105 (26.7%)
Ascites	59 (15.0%)
Spontaneous bacterial peritonitis	4 (1.0%)
Hepatic encephalopathy	34 (8.7%)
Hepatocellular carcinoma ^a	55 (8.1%)
Mortality ^a	94 (13.8%)
Liver related	52 (55.3%)
Not liver related	36 (38.3%)
Skewed	6 (6.4%)
Transplant ^a	55 (8.1%)

^an (%) ^b mean(±sd) ^c data available for 373 patients

Table 3: Polymorphisms with tendency towards association with worsening of fibrosis.

Chr	Gene	SNP	Minor	Model		Affecteds (n)	Unaffecteds (n)	OR	95% C.I.	P	P adjusted*
<u>Worsening of fibrosis (> 2 Ishak points)</u>											
4	GC	rs7041	A	Additive	A	0.42 (84)	0.55 (291)	0.59	0.41-0.86	0.004872	0.1949
					C	0.58 (116)	0.45 (241)				
				Dominant	AA + AC	0.64 (64)	0.79 (210)	0.47	0.28-0.80		
					CC	0.36 (36)	0.21 (56)				
4	GC	rs222020	C	Additive	C	0.16 (31)	0.27 (142)	0.55	0.35-0.85	0.07682	0.3073
					T	0.84 (169)	0.73 (390)				
				Dominant	CC + CT	0.27 (27)	0.44 (116)	0.50	0.29-0.84		
					TT	0.73 (73)	0.56 (150)				
15	SMAD3	rs2118610	T	Additive	T	0.48 (95)	0.38 (202)	1.51	1.07-2.12	0.01806	0.7222
					C	0.52 (105)	0.68 (330)				
				Dominant	TT + TC	0.76 (76)	0.62 (164)	2.06	1.21-3.49		
					CC	0.24 (24)	0.38 (102)				

* Bonferroni's correction

Table 4: Polymorphisms with tendency towards association and associated with hepatic decompensation, bleeding from gastric or esophageal varices, Child-Turcotte-Pugh Score > 7, ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatic encephalopathy.

Chr	Gene	SNP	Minor	Model		Affected (n)	Unaffected (n)	OR	95% C.I.	P	P adjusted*
<u>Hepatic decompensation</u>											
11	<i>DHCR7</i>	rs4944957	A	Dominant	AA + AG	0.54 (68)	0.50 (134)	1.56	1.02-2.38	0.04185	1
					GG	0.46 (58)	0.50 (133)				
11	<i>DHCR7</i>	rs12800438	G	Dominant	GG + GA	0.55 (69)	0.51 (136)	1.56	1.02-2.40	0.04115	1
					AA	0.45 (57)	0.49 (131)				
11	<i>DHCR7</i>	rs3829251	A	Dominant	AA+ AG	0.34 (43)	0.69 (87)	1.58	1.03-2.44	0.0374	1
					GG	0.66 (83)	0.31 (180)				
11	<i>DHCR7</i>	rs4945008	A	Dominant	AA + AG	0.60 (76)	0.55 (146)	1.58	1.01-2.47	0.04309	1
					GG	0.40 (50)	0.45 (121)				
19	<i>TGFB1</i>	rs1800469	A	Recessive	AA	0.19 (24)	0.08 (22)	3.22	1.69-6.12	0.000369	0.01475
					AG + GG	0.81 (102)	0.92 (245)				
<u>Bleeding from gastric or esophageal varices</u>											
11	<i>DHCR7</i>	rs4944957	A	Recessive	AA	0.30 (3)	0.10 (38)	4.68	1.08-20.18	0.03867	1
					AG + GG	0.70 (7)	0.90 (325)				
11	<i>DHCR7</i>	rs12800438	G	Recessive	GG	0.30 (3)	0.12 (43)	4.42	1.01-19.4	0.04926	1
					GA + AA	0.70 (7)	0.88 (320)				
12	<i>VDR</i>	rs4516035	C	Additive	C	0.65 (13)	0.38 (273)	2.66	1.08-6.58	0.03394	1
					T	0.35 (7)	0.62 (453)				
<u>Child-Turcotte-Pugh Score > 7</u>											
19	<i>TGFB1</i>	rs1800469	A	Recessive	AA	0.18 (19)	0.09 (27)	2.30	1.20-4.41	0.01204	0.4815
					AG + GG	0.82 (86)	0.91 (261)				
<u>Ascites</u>											
11	<i>CYP2R1</i>	rs7116978	T	Dominant	TT + TC	0.71 (42)	0.55 (183)	2.08	1.13-3.82	0.01799	0.7196
					CC	0.29 (17)	0.45 (151)				
<u>Hepatic encephalopathy</u>											
15	<i>SMAD3</i>	rs2118610	T	Additive	T	0.62 (21)	0.72 (258)	0.57	0.33-0.99	0.04641	1
					C	0.38 (13)	0.28 (101)				

* Bonferroni's correction

Table 5: Polymorphisms with tendency towards association with hepatocellular carcinoma and liver death that showed statistical significance.

Chr	Gene	SNP	Minor	Model		Affecteds (n)	Unaffecteds (n)	OR	95% C.I.	P	P adjusted*
<u>Hepatocellular carcinoma</u>											
11	<i>CYP2R1</i>	rs1562902	C	Recessive	CC	0.31 (17)	0.19 (122)	1.86	1.006-3.44	0.04778	1
					CT + TT	0.69 (38)	0.81 (504)				
12	<i>VDR</i>	rs2239186	G	Recessive	GG	0.09 (5)	0.03 (18)	2.978	1.036-8.561	0.04278	1
					GA + AA	0.91 (50)	0.97 (608)				
<u>Liver death</u>											
4	<i>GC</i>	rs7041	A	Recessive	AA	0.19 (19)	0.28 (165)	0.5589	0.3164-0.987	0.04496	1
					AC + CC	0.81 (80)	0.72 (417)				

* Bonferroni's correction

Table 6: Comparison of risk alleles identified in the present study to the literature.

Gene	SNP	Current study		Literature		
		Risk Allele	Effect	Risk Allele	Effect	Studies
<i>DHCR7</i>	rs4944957	A	<i>Hepatic decompensation</i> <i>Gastric/esophageal bleeding</i>	-	<i>Vitamin D serum levels</i>	<i>Wang, 2010</i>
	rs12800438	G	<i>Hepatic decompensation</i> <i>Gastric/esophageal bleeding</i>	-	<i>Vitamin D serum levels</i>	<i>Wang, 2010</i>
	rs3829251	A	<i>Hepatic decompensation</i>	A	<i>Vitamin D serum levels</i>	<i>Ahn, 2010; Lu, 2012; Kuhn, 2013</i>
	rs4945008	A	<i>Hepatic decompensation</i> <i>Gastric/esophageal bleeding</i>	-	<i>Vitamin D serum levels</i>	<i>Wang, 2010</i>
GC	rs7041	C	<i>Worsening of fibrosis</i> <i>Liver death</i>	A	<i>Vitamin D serum levels</i>	<i>Wang, 2010; Ahn 2010; Lu, 2012; Batai, 2014</i>
	rs222020	T	<i>Worsening of fibrosis</i>	T / C	<i>Vitamin D serum levels</i>	<i>Porter, 2013; Xu, 2014, Bu, 2010; Zhang, 2012</i>
<i>CYP2R1</i>	rs7116978	T	<i>Ascites</i>	C	<i>Vitamin D serum levels</i>	<i>Nissen, 2014</i>
	rs1562902	C	<i>HCC</i>	C / T	<i>Vitamin D serum levels</i>	<i>Wjst, 2006, Bu,2010; Zhang, 2012; Nissen, 2014</i>
<i>VDR</i>	rs4516035	C	<i>Gastric/esophageal bleeding</i>	C	<i>Liver fibrosis</i>	<i>Beilfuss,2015</i>
	rs2239186	G	<i>HCC</i>	G / A	<i>Vitamin D serum levels</i>	<i>Wjst, 2006; Yao, 2012</i>
<i>SMAD3</i>	rs2118610	T / C	<i>Worsening of fibrosis</i> <i>Hepatic encephalopathy</i>	C	<i>Skin scarring</i>	<i>Brown, 2008</i>
<i>TGFB1</i>	rs1800469*	A	<i>Hepatic decompensation</i> <i>CTP>7</i>	A	<i>HCC and cirrhosis</i>	<i>Radwan, 2012; Mohy, 2014; Ma, 2015</i>

* Polymorphism associated after Bonferroni's correction.

Supplementary Material

Supplementary Table S1: Quality of imputed polymorphisms.

Supplementary Table S2: Polymorphisms associated with the analyzed covariates (race, age and sex).

Supplementary Table S3: Results of the logistic regression analysis of all SNPs under the additive model for worsening of fibrosis, hepatic decompensation, liver death, and hepatocellular carcinoma.

Supplementary Table S1: Quality of imputed polymorphisms.

Gene	dbSNP	Major allele	Minor allele	MAF	Rsq
<i>GC</i>	rs115316390*	G	A	0.0001	0.0431
	rs17467825	A	G	0.2422	0.9360
	rs222020	T	C	0.2268	0.7561
	rs2298850	G	C	0.2348	0.8257
	rs3755967	C	T	0.2418	0.9548
	rs4588	G	T	0.2463	0.8018
	rs221999	A	G	0.2531	0.6837
<i>CYP2R1</i>	rs10741657	G	A	0.3576	0.9929
	rs10766197	G	A	0.4189	0.8982
	rs7116978	C	T	0.3469	0.7671
<i>DHCR7</i>	rs12785878	G	T	0.3541	0.9876
	rs4945008	A	G	0.3833	0.7196
	rs4944957	A	G	0.3093	0.9650
<i>VDR</i>	rs731236	A	G	0.3639	0.8463
	rs7975232	A	C	0.4746	0.8314
<i>CYP27B1</i>	rs10877102	G	A	0.1910	0.9458
<i>SMAD3</i>	rs9806504	T	C	0.0233	0.9720
	rs11071932	A	G	0.0373	0.7504
<i>TGFB1</i>	rs1800471*	C	G	0.0599	0.2405
	rs1800469	G	A	0.3345	0.9324
<i>CYP24A1</i>	rs73913757	C	T	0.0228	0.6061
	rs17219315*	A	G	0.0143	0.2502
	rs2244719*	T	C	0.4585	0.2344

*SNPs removed due to low imputation quality. MAF: minor allele frequency. Rsq: squared correlation.

Supplementary Table S2: Polymorphisms associated with the analyzed covariates (race, age and sex).

Race		Age		Sex	
Chr	dbSNP	Chr	dbSNP	Chr	dbSNP
4	rs7041	4	rs222020	4	rs7041
4	rs2298849	4	rs7041	11	rs3794060
4	rs2298850	11	rs10741657	11	rs4945008
4	rs17467825	11	rs1993116	12	rs4516035
4	rs2282679	11	rs2060793		
4	rs3755967				
4	rs4588				
4	rs221999				
11	rs4945008				
11	rs7944926				
11	rs12785878				
11	rs12800438				
11	rs10766197				
11	rs4944957				
11	rs10500804				
11	rs12794714				
11	rs11234027				
11	rs1562902				
11	rs1993116				
11	rs10741657				
11	rs3829251				
12	rs4516035				
12	rs731236				
12	rs1544410				
12	rs10877012				
12	rs2239186				
15	rs11071932				
15	rs9806504				
15	rs2118610				
20	rs73913757				

Supplementary Table 3: Results of the logistic regression analysis of all SNPs under the additive model for the primary outcomes (worsening of fibrosis, hepatic decompensation, liver death, and hepatocellular carcinoma).

Chr	dbSNP	Minor	MAF aff	MAF un	OR	95% C.I.	P	MAF aff	MAF un	OR	95% C.I.	P	MAF aff	MAF un	OR	95% C.I.	P	MAF aff	MAF un	OR	95% C.I.	P
<i>Worsening of fibrosis</i>							<i>Hepatic decompensation</i>						<i>Hepatocellular carcinoma</i>						<i>Liver death</i>			
4	rs17467825	G	0.205	0.2199	0.8767	0.8767-0.5912	0.5125	0.2103	0.264	1.034	1.034-0.7394	0.8467	0.1909	0.2372	0.8255	0.8255-0.5049	0.4444	0.2172	0.2363	0.9044	0.9044-0.6308	0.5846
4	rs2282679	G	0.205	0.2199	0.8767	0.8767-0.5912	0.5125	0.2103	0.264	1.034	1.034-0.7394	0.8467	0.1909	0.2372	0.8255	0.8255-0.5049	0.4444	0.2172	0.2363	0.9044	0.9044-0.6308	0.5846
4	rs3755967	T	0.205	0.2199	0.8767	0.8767-0.5912	0.5125	0.2103	0.264	1.034	1.034-0.7394	0.8467	0.1909	0.2372	0.8255	0.8255-0.5049	0.4444	0.2172	0.2363	0.9044	0.9044-0.6308	0.5846
4	rs2298850	C	0.2	0.218	0.855	0.855-0.5744	0.4402	0.2063	0.2622	1.027	1.027-0.7337	0.8777	0.1818	0.2356	0.7853	0.7853-0.4759	0.3441	0.2121	0.2345	0.8838	0.8838-0.6145	0.5054
4	rs4588	T	0.2	0.2237	0.8345	0.8345-0.5612	0.3716	0.2063	0.264	1.016	1.016-0.7265	0.9249	0.1818	0.2388	0.7603	0.7603-0.4606	0.2841	0.2121	0.238	0.8646	0.8646-0.6011	0.4326
4	rs7041	A	0.42	0.547	0.5944	0.5944-0.4138	0.004872	0.4365	0.5019	0.9639	0.9639-0.7173	0.8075	0.4636	0.5056	0.7295	0.7295-0.4869	0.1263	0.4545	0.5103	0.7966	0.7966-0.5834	0.1523
4	rs222020	C	0.155	0.2669	0.5495	0.5495-0.3538	0.007682	0.1786	0.1835	0.8805	0.8805-0.5955	0.5236	0.2455	0.2157	0.9774	0.9774-0.6114	0.924	0.2424	0.2139	1.169	1.169-0.8138	0.3975
4	rs1155563	C	0.22	0.2218	0.969	0.969-0.6572	0.8739	0.2341	0.2528	1.121	1.121-0.8053	0.4975	0.2	0.2364	0.8453	0.8453-0.5266	0.4864	0.2172	0.2363	0.9014	0.9014-0.6307	0.5687
4	rs2298849	G	0.19	0.2594	0.7038	0.7038-0.4696	0.0888	0.2143	0.206	0.9914	0.9914-0.6909	0.9627	0.2182	0.2324	0.8239	0.8239-0.5095	0.4295	0.2778	0.2234	1.33	1.33-0.9416	0.1055
4	rs221999	G	0.21	0.218	0.9305	0.9305-0.6254	0.7225	0.2262	0.2547	1.038	1.038-0.739	0.831	0.2	0.2332	0.8582	0.8582-0.5303	0.5335	0.2121	0.2337	0.8867	0.8867-0.6148	0.5201
11	rs7116978	T	0.35	0.3402	1.002	1.002-0.7135	0.9912	0.3929	0.3333	1.1	1.1-0.8157	0.532	0.4182	0.3435	1.401	1.401-0.9376	0.09991	0.3687	0.3462	1.108	1.108-0.8102	0.5207
11	rs1993116	A	0.355	0.3365	1.012	1.012-0.7185	0.9455	0.4127	0.3464	1.145	1.145-0.8476	0.3777	0.4	0.353	1.316	1.316-0.877	0.1848	0.3485	0.3582	0.9627	0.9627-0.7002	0.8149
11	rs10500804	G	0.39	0.4117	0.8597	0.8597-0.6126	0.3817	0.3849	0.4045	1.146	1.146-0.8571	0.3585	0.3455	0.4018	0.8857	0.8857-0.584	0.5677	0.3687	0.4021	0.8819	0.8819-0.6446	0.4323
11	rs12794714	A	0.39	0.4098	0.867	0.867-0.6185	0.4075	0.3849	0.3989	1.173	1.173-0.8775	0.2817	0.3455	0.3994	0.8957	0.8957-0.5911	0.6035	0.3687	0.3995	0.8928	0.8928-0.6529	0.4776
11	rs10741657	A	0.35	0.3271	1.034	1.034-0.7335	0.8476	0.4048	0.3408	1.148	1.148-0.8442	0.3792	0.3818	0.3474	1.252	1.252-0.8285	0.2863	0.3384	0.3522	0.9432	0.9432-0.6826	0.7228
11	rs2060793	A	0.38	0.3477	1.106	1.106-0.7872	0.562	0.4286	0.3614	1.101	1.101-0.8117	0.5371	0.4364	0.3658	1.399	1.399-0.9321	0.1051	0.3788	0.3703	1.044	1.044-0.7609	0.7883
11	rs1562902	C	0.435	0.4305	1.013	1.013-0.7363	0.9352	0.4643	0.427	0.9345	0.9345-0.6987	0.6477	0.5182	0.4313	1.376	1.376-0.9317	0.1086	0.4444	0.4373	1.022	1.022-0.7583	0.8856
11	rs10766197	A	0.385	0.4267	0.7688	0.7688-0.5486	0.1268	0.4087	0.4101	1.268	1.268-0.9482	0.1093	0.3273	0.4193	0.7819	0.7819-0.5125	0.2537	0.3737	0.4184	0.8437	0.8437-0.6181	0.2843
11	rs1790349	C	0.15	0.1748	0.8428	0.8428-0.5384	0.4543	0.1548	0.1742	1.174	1.174-0.8128	0.3929	0.1818	0.1709	1.073	1.073-0.6562	0.7795	0.1919	0.1684	1.154	1.154-0.7928	0.4544
11	rs7944926	A	0.345	0.3703	0.9945	0.9945-0.6893	0.9764	0.3651	0.3483	1.228	1.228-0.8962	0.2012	0.4273	0.3586	1.129	1.129-0.7364	0.5777	0.3788	0.3617	1.061	1.061-0.7612	0.7282
11	rs12785878	G	0.345	0.3703	0.9945	0.9945-0.6893	0.9764	0.3651	0.3483	1.228	1.228-0.8962	0.2012	0.4273	0.3586	1.129	1.129-0.7364	0.5777	0.3788	0.3617	1.061	1.061-0.7612	0.7282
11	rs4944957	A	0.295	0.312	0.9649	0.9649-0.6683	0.8487	0.3294	0.3015	1.361	1.361-0.9918	0.0563	0.3545	0.3099	1.115	1.115-0.7268	0.6186	0.3333	0.3101	1.098	1.098-0.7885	0.5797
11	rs12800438	G	0.305	0.3365	0.9208	0.9208-0.6372	0.6606	0.3413	0.3127	1.336	1.336-0.9776	0.06906	0.3545	0.3299	0.9793	0.9793-0.6363	0.9242	0.3384	0.3308	1.017	1.017-0.7291	0.922
11	rs3794060	C	0.35	0.3778	0.9939	0.9939-0.6842	0.9745	0.373	0.3483	1.264	1.264-0.9225	0.145	0.4364	0.3634	1.153	1.153-0.7486	0.5185	0.3838	0.3668	1.066	1.066-0.7633	0.7071
11	rs3829251	A	0.155	0.1767	0.8769	0.8769-0.5625	0.5619	0.1865	0.1835	1.458	1.458-1.013	0.0426	0.1909	0.1821	1.013	1.013-0.615	0.9597	0.1919	0.1813	1.059	1.059-0.7212	0.7705
11	rs4945008	A	0.35	0.3778	0.9926	0.9926-0.6832	0.9691	0.381	0.3521	1.283	1.283-0.936	0.1214	0.4364	0.3666	1.133	1.133-0.7351	0.5709	0.3889	0.3694	1.078	1.078-0.7718	0.659
11	rs11234027	A	0.17	0.1917	0.9097	0.9097-0.5906	0.6677	0.1944	0.1985	1.268	1.268-0.8838	0.1974	0.2182	0.1941	1.08	1.08-0.6674	0.7545	0.2071	0.1942	1.077	1.077-0.7386	0.7001
12	rs731236	G	0.375	0.3741	0.9653	0.9653-0.6815	0.8427	0.3571	0.3858	0.9421	0.9421-0.6986	0.6961	0.3273	0.3682	0.8992	0.8992-0.5846	0.6287	0.3535	0.3668	0.9375	0.9375-0.6795	0.6941
12	rs7975232	C	0.455	0.4718	0.9164	0.9164-0.6615	0.5994	0.5	0.4326	1.275	1.275-0.9586	0.09511	0.4636	0.4712	0.9869	0.9869-0.6667	0.9477	0.4848	0.4682	1.079	1.079-0.7998	0.6171
12	rs757343	T	0.1	0.09398	1.108	1.108-0.6179	0.7312	0.1111	0.118	1.046	1.046-0.6726	0.8418	0.1455	0.1038	1.43	1.43-0.8094	0.218	0.101	0.1082	0.9184	0.9184-0.5552	0.7403
12	rs1544410	T	0.39	0.3741	1.037	1.037-0.7348	0.8376	0.3532	0.3914	0.8848	0.8848-0.6568	0.421	0.3	0.3722	0.7739	0.7739-0.5011	0.2478	0.3535	0.3686	0.9324	0.9324-0.6773	0.6677
12	rs2239186	G	0.2	0.1541	1.309	1.309-0.8598	0.2094	0.1786	0.1929	0.899	0.899-0.6175	0.5784	0.2091	0.1757	1.302	1.302-0.8079	0.2784	0.1667	0.1804	0.9033	0.9033-0.6037	0.6209
12	rs4516035	C	0.41	0.3346	1.302	1.302-0.92	0.1365	0.3968	0.367	1.248	1.248-0.9315	0.1376	0.3364	0.3538	1.047	1.047-0.6948	0.8274	0.3434	0.354	0.9466	0.9466-0.6908	0.7329
12	rs10877012	T	0.275	0.3139	0.8179	0.8179-0.5774	0.2577	0.3135	0.294	1.071	1.071-0.785	0.6651	0.3364	0.3035	1.202	1.202-0.8004	0.3757	0.2929	0.3084	0.9303	0.9303-0.6737	0.6608
15	rs9806504	C	0.035	0.02632	1.699	1.699-0.6949	0.2452	0.03571	0.02622	0.9036	0.9036-0.3855	0.8156	0.02727	0.02716	0.7131	0.7131-0.2225	0.5695	0.03535	0.02577	1.306	1.306-0.573	0.5252
15	rs11071932	G	0.05	0.04511	1.501	1.501-0.667	0.3263	0.04762	0.0412	0.7569	0.7569-0.3511	0.4771	0.05455	0.04153	0.9643	0.9643-0.39	0.9372	0.06566	0.03866	1.857	1.857-0.9302	0.07931
15	rs2118610	T	0.475	0.3797	1.507	1.507-1.073	0.01806	0.4405	0.4419	0.9851	0.9851-0.7245	0.9235	0.4455	0.4145	1.187	1.187-0.7896	0.4092	0.4545	0.4107	1.208	1.208-0.8855	0.2332
19	rs1800469	A	0.36	0.3289	1.158	1.158-0.8048	0.4292	0.3929	0.3258	1.364	1.364-0.9996	0.05032	0.3273	0.3371	0.8888	0.8888-0.5832	0.5835	0.3737	0.3299	1.194	1.194-0.868	0.2759
20	rs2296241	G	0.48	0.4812	1.045	1.045-0.7433	0.7995	0.5079	0.4569	1.133	1.133-0.8472	0.4005	0.4636	0.48	0.8946	0.8946-0.6025	0.5808	0.4899	0.4768	1.055	1.055-0.7782	0.731
20	rs73913757	T	0.005	0.0282	0.2118	0.2118-0.02755	0.1359	0.0119	0.01685	0.8525	0.8525-0.2628	0.7904	0.02727	0.01997	0.9579	0.9579-0.2904	0.9437	0.01515	0.02148	0.6715	0.6715-0.2047	0.5113

MAF aff: Minor allele frequency of affected patients; MAF un: Minor allele frequency of unaffected patients; OR: odds ratio.

10 CONCLUSÕES

1. Níveis séricos diminuídos de vitamina D, bem como a deficiência grave de vitamina D, foram mais frequentes entre pacientes com fibrose avançada (METAVIR 3 e 4).
2. Os genótipos AA do polimorfismo rs7041 e TT do rs4588 do gene *GC*, bem como a combinação dos diplótipos TA/TA e GA/TA, foram responsáveis por níveis menores de vitamina D nos pacientes com hepatite C crônica genótipo 1.
3. Embora os polimorfismos rs7041 e rs4588 e seus haplótipos tenham relação com os níveis séricos de vitamina D, estes não apresentaram associação com o grau de fibrose hepática.
 - 4.1. Dos 40 polimorfismos avaliados na coorte de pacientes com hepatite C crônica do estudo HALT-C, nove tiveram tendência à associação com os desfechos primários:
 - rs7041 (*GC*), rs222020 (*GC*) e rs2118610 (*SMAD3*) com piora da fibrose;
 - rs4944957 (*DHCR7*), rs12800438 (*DHCR7*), rs3829251 (*DHCR7*) e rs4945008 (*DHCR7*) com descompensação hepática;
 - rs1562902 (*CYP2R1*) e rs2239186 (*VDR*) com carcinoma hepatocelular;
 - rs7041 (*GC*) com morte do fígado.
 - 4.2. Dos 40 polimorfismos avaliados na coorte de pacientes com hepatite C crônica do estudo HALT-C, apenas o rs1800469 (*TGFBI*) foi associado estatisticamente com descompensação hepática após correção de Bonferroni.
- 5.1. Dos 40 polimorfismos avaliados na coorte de pacientes com hepatite C crônica do estudo HALT-C, seis tiveram tendência à associação com os desfechos secundários:
 - rs4944957 (*DHCR7*), rs12800438 (*DHCR7*) e rs4516035 (*VDR*) com sangramento de varizes gastresofágicas;

- rs1800469 (*TGFB1*) com escore Child-Pugh Turcote >7;
- rs7116978 (*CYP2R1*) com ascite;
- rs2118610 (*SMAD3*) com encefalopatia hepática.

5.2. Dos 40 polimorfismos avaliados na coorte de pacientes com hepatite C crônica do estudo HALT-C, nenhum foi associado estatisticamente com os desfechos secundários após correção de Bonferroni.

Nossos resultados corroboram que níveis séricos diminuídos de vitamina D possuem relação com maior fibrose na hepatite C crônica e que, a influência das variantes genéticas da sua rota metabólica, apesar de promissora, ainda é controversa, merecendo validação em outra coorte.

11 PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, a influência da vitamina D nas doenças do fígado tem sido amplamente discutida, já que esta sofre metabolismo hepático. Além disso, a possibilidade de fácil reposição por suplementação a torna um alvo terapêutico atrativo. Existe associação entre doenças hepáticas e deficiência de vitamina D, embora não seja muito clara qual a causa e qual a consequência.

Nesta tese foram avaliadas duas amostras de pacientes com hepatite C crônica (HCC). Um estudo transversal com 132 pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e uma coorte de 681 pacientes americanos acompanhados por quatro anos, extraídos de uma base de dados de genotipagem pública. Na amostra de pacientes do HCPA, os níveis séricos de vitamina D, bem como a deficiência grave ($<10\text{ng/mL}$), foram relacionados com graus maiores de fibrose. Infelizmente, na coorte HALT-C os níveis séricos de vitamina D não foram determinados e, conseqüentemente, esta comparação não foi possível.

No que concerne as variantes genéticas da rota metabólica da vitamina D, descrevemos que o alelo A do polimorfismo rs7041 e o alelo T do polimorfismo rs4588 do gene *GC*, que codifica a GC-globulina (proteína de transporte da vitamina D), tiveram relação com menores níveis de vitamina D na amostra do HCPA, embora ambos os polimorfismos e a composição de seus haplótipos, não tenham tido relação com a fibrose hepática nestes pacientes. Já na amostra da coorte HALT-C, o alelo C do rs7041 obteve tendência à associação estatística com a piora da fibrose, mostrando-se discordante do resultado da amostra HCPA e da literatura.

Além disso, outros onze polimorfismos foram relacionados, também apenas com tendência à associação estatística, com os diferentes desfechos da evolução da hepatite C na coorte HALT-C. Por se tratar de estudo exploratório, os autores decidiram apresentar os

resultados das análises sem correção para análises múltiplas, necessitando que seja feita confirmação destes achados em outra amostra. Foram descritos polimorfismos em genes relacionados à formação da vitamina D- *DHCR7* e *CYP2R1*, bem como genes envolvidos na ação da vitamina D- *VDR*, *SMAD3* e *TGFB1*. O polimorfismo com maior poder estatístico nesta coorte foi o polimorfismo imputado rs1800469 do gene *TGFB1*, associado com descompensação hepática após correção de Bonferroni ($P < 0,05/40$). Embora esta associação não comprove relação da vitamina D com evolução da HCC, ela aponta um polimorfismo com potencial utilidade na identificação de pacientes com maior chance de evoluir para uma doença mais grave.

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wang LS, D'Souza LS, Jacobson IM. Hepatitis C- A clinical review. *Journal of medical virology*. 2016. Epub 2016/04/21.
2. Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterology clinics of North America*. 2015;44(4):717-34. Epub 2015/11/26.
3. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *Journal of hepatology*. 2006;44(1):217-31. Epub 2005/11/22.
4. Hong TP, Gow P, Fink M, Dev A, Roberts S, Nicoll A, et al. Novel Population-Based Study Finding Higher Than Reported Hepatocellular Carcinoma Incidence Suggests an Updated Approach Is Needed. *Hepatology*. 2016;63(4):1205-12.
5. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *Journal of hepatology*. 2006;45(4):529-38. Epub 2006/08/02.
6. Wintermeyer E, Ihle C, Ehnert S, Stockle U, Ochs G, de Zwart P, et al. Crucial Role of Vitamin D in the Musculoskeletal System. *Nutrients*. 2016;8(6). Epub 2016/06/04.
7. Maeda S, Borba V, Camargo M, Silva D, Borges J, Bandeira F, et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2014;58(5):411-33.
8. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Simon KC, McCullough ML, Gallicchio L, et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Human molecular genetics*. 2010;19(13):2739-45. Epub 2010/04/27.
9. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet*. 2010;376(9736):180-8. Epub 2010/06/15.
10. Batai K, Murphy AB, Shah E, Ruden M, Newsome J, Agate S, et al. Common vitamin D pathway gene variants reveal contrasting effects on serum vitamin D levels in African Americans and European Americans. *Human genetics*. 2014;133(11):1395-405. Epub 2014/08/03.
11. Baur K, Mertens JC, Schmitt J, Iwata R, Stieger B, Eloranta JJ, et al. Combined effect of 25-OH vitamin D plasma levels and genetic Vitamin D Receptor (NR 1I1) variants on fibrosis progression rate in HCV patients. *Liver Int*. 2012;32(4):635-43.

12. Finkelmeier F, Kronenberger B, Zeuzem S, Piiper A, Waidmann O. Low 25-Hydroxyvitamin D Levels Are Associated with Infections and Mortality in Patients with Cirrhosis. *Plos One*. 2015;10(6):e0132119. Epub 2015/06/30.
13. Fedirko V, Duarte-Salles T, Bamia C, Trichopoulou A, Aleksandrova K, Trichopoulos D, et al. Prediagnostic circulating vitamin D levels and risk of hepatocellular carcinoma in European populations: a nested case-control study. *Hepatology*. 2014;60(4):1222-30. Epub 2014/03/20.
14. Garcia-Alvarez M, Pineda-Tenor D, Jimenez-Sousa MA, Fernandez-Rodriguez A, Guzman-Fulgencio M, Resino S. Relationship of Vitamin D Status With Advanced Liver Fibrosis and Response to Hepatitis C Virus Therapy: A Meta-analysis. *Hepatology*. 2014;60(5):1541-50.
15. Ding N, Yu RT, Subramaniam N, Sherman MH, Wilson C, Rao R, et al. A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. *Cell*. 2013;153(3):601-13. Epub 2013/04/30.
16. Prince AM, Grady GF, Hazzi C, Brotman B, Kuhns WJ, Levine RW, et al. Long-Incubation Post-Transfusion Hepatitis without Serological Evidence of Exposure to Hepatitis-B Virus. *Lancet*. 1974;2(7875):241-6.
17. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a Cdna Clone Derived from a Blood-Borne Non-a, Non-B Viral-Hepatitis Genome. *Science*. 1989;244(4902):359-62.
18. Lanini S, Easterbrook PJ, Zumla A, Ippolito G. Hepatitis C: global epidemiology and strategies for control. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(10):833-8. Epub 2016/08/16.
19. BRASIL. Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais. In: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST AeHV, editor.2015.
20. BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 2015.
21. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014;59(1):318-27. Epub 2013/10/12.
22. Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(1):41-9.
23. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1655-69.

24. Sherlock S, Dooley S. Doenças do Fígado e do Sistema Biliar. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 599 p.
25. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*. 2008;88(1):125-72. Epub 2008/01/16.
26. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011;25(2):195-206. Epub 2011/04/19.
27. Liu T, Wang X, Karsdal MA, Leeming DJ, Genovese F. Molecular serum markers of liver fibrosis. *Biomarker insights*. 2012;7:105-17. Epub 2012/08/09.
28. Everhart JE, Wright EC, Goodman ZD, Dienstag JL, Hoefs JC, Kleiner DE, et al. Prognostic value of Ishak fibrosis stage: findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Hepatology*. 2010;51(2):585-94. Epub 2010/01/27.
29. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*. 1981;1(5):431-5. Epub 1981/09/01.
30. Batts KP. Acute and chronic hepatic allograft rejection: pathology and classification. *Liver Transpl Surg*. 1999;5(4 Suppl 1):S21-9. Epub 1999/08/04.
31. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol*. 1991;13(3):372-4. Epub 1991/11/01.
32. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996;24(2):289-93.
33. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology*. 1995;22(6):696-9. Epub 1995/06/01.
34. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pyrsopoulos NT, et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(10):2614-8. Epub 2002/10/19.
35. Friedrich-Rust M, Poynard T, Castera L. Critical comparison of elastography methods to assess chronic liver disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2016. Epub 2016/06/09.
36. Petta S, Grimaudo S, Marco VD, Scazzone C, Macaluso FS, Camma C, et al. Association of vitamin D serum levels and its common genetic determinants, with severity of liver fibrosis in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat*. 2013;20(7):486-93. Epub 2013/06/05.

37. Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology*. 2010;51(4):1445-9. Epub 2010/01/16.
38. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *The British journal of surgery*. 1973;60(8):646-9. Epub 1973/08/01.
39. Razavi H, Waked I, Sarrazin C, Myers RP, Idilman R, Calinas F, et al. The present and future disease burden of hepatitis C virus (HCV) infection with today's treatment paradigm. *J Viral Hepat*. 2014;21 Suppl 1:34-59. Epub 2014/04/10.
40. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86. Epub 2014/09/16.
41. Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis*. 1999;19(3):329-38. Epub 1999/10/13.
42. Pawlotsky JM, Feld JJ, Zeuzem S, Hoofnagle JH. From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure. *J Hepatol*. 2015;62(1 Suppl):S87-99. Epub 2015/04/29.
43. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009;461(7262):399-401. Epub 2009/08/18.
44. Donnelly RP, Dickensheets H, O'Brien TR. Interferon-lambda and therapy for chronic hepatitis C virus infection. *Trends Immunol*. 2011;32(9):443-50.
45. Gotte M, Feld JJ. Direct-acting antiviral agents for hepatitis C: structural and mechanistic insights. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2016;13(6):338-51. Epub 2016/05/06.
46. Guidelines for the Screening Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis C Infection: Updated Version. Geneva2016.
47. Dore GJ, Ward J, Thursz M. Hepatitis C disease burden and strategies to manage the burden (Guest Editors Mark Thursz, Gregory Dore and John Ward). *J Viral Hepat*. 2014;21 Suppl 1:1-4. Epub 2014/04/10.
48. Deluca HF. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *BoneKEY reports*. 2014;3:479. Epub 2014/01/28.
49. Peixoto PV, Klem MAP, Franca TN, Nogueira VA. Vitamin D poisoning in animals. *Pesqui Vet Brasil*. 2012;32(7):573-94.

50. Stokes CS, Volmer DA, Grunhage F, Lammert F. Vitamin D in chronic liver disease. *Liver Int.* 2012;33(3):338-52.
51. Moy KA, Mondul AM, Zhang H, Weinstein SJ, Wheeler W, Chung CC, et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D-binding protein. *The American journal of clinical nutrition.* 2014;99(6):1424-31. Epub 2014/04/18.
52. Christiansen M, Jorgensen CS, Laursen I, Hirschberg D, Hojrup P, Houen G. Protein chemical characterization of Gc globulin (vitamin D-binding protein) isoforms; Gc-1f, Gc-1s and Gc-2. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1774(4):481-92. Epub 2007/03/16.
53. Arnaud J, Constans J. Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP). *Hum Genet.* 1993;92(2):183-8. Epub 1993/09/01.
54. Santos BR, Mascarenhas LPG, Boguszewski MCS, Spritzer PM. Variations in the Vitamin D-Binding Protein (DBP) Gene Are Related to Lower 25-Hydroxyvitamin D Levels in Healthy Girls: A Cross-Sectional Study. *Hormone research in paediatrics.* 2013;79(3):162-8.
55. Zhang F, Moayyeri A, Spector TD. Genetic Influences on Circulating Vitamin D Level: A Review. *Curr Cardiovasc Risk Rep.* 2012;6(6):549-55.
56. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Annals of epidemiology.* 2009;19(2):73-8. Epub 2008/03/11.
57. Bitetto D, Fattovich G, Fabris C, Ceriani E, Falleti E, Fornasiere E, et al. Complementary role of vitamin D deficiency and the interleukin-28B rs12979860 C/T polymorphism in predicting antiviral response in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2011;53(4):1118-26.
58. Falleti E, Bitetto D, Fabris C, Fattovich G, Cussigh A, Cmet S, et al. Vitamin D binding protein gene polymorphisms and baseline vitamin D levels as predictors of antiviral response in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2012.
59. Pearce SH, Cheetham TD. Diagnosis and management of vitamin D deficiency. *BMJ.* 2010;340:b5664. Epub 2010/01/13.
60. Schottker B, Jorde R, Peasey A, Thorand B, Jansen EH, Groot L, et al. Vitamin D and mortality: meta-analysis of individual participant data from a large consortium of cohort studies from Europe and the United States. *BMJ.* 2014;348:g3656. Epub 2014/06/19.
61. Chen EQ, Shi Y, Tang H. New insight of vitamin D in chronic liver diseases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2014;13(6):580-5. Epub 2014/12/06.

62. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(7):1911-30. Epub 2011/06/08.
63. Iruzubieta P, Teran A, Crespo J, Fabrega E. Vitamin D deficiency in chronic liver disease. *World J Hepatol*. 2014;6(12):901-15. Epub 2014/12/30.
64. Han YP, Kong M, Zheng S, Ren Y, Zhu L, Shi H, et al. Vitamin D in liver diseases: from mechanisms to clinical trials. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28 Suppl 1:49-55. Epub 2013/07/24.
65. Rahman AH, Branch AD. Vitamin D for your patients with chronic hepatitis C? *Journal of hepatology*. 2013;58(1):184-9. Epub 2012/08/09.
66. Ding N, Liddle C, Evans RM, Downes M. Hepatic actions of vitamin D receptor ligands: a sunshine option for chronic liver disease? *Expert review of clinical pharmacology*. 2013;6(6):597-9. Epub 2013/10/30.
67. Firrincieli D, Braescu T, Housset C, Chignard N. Illuminating liver fibrosis with vitamin D. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2014;38(1):5-8. Epub 2013/11/19.
68. Lim LY, Chalasani N. Vitamin d deficiency in patients with chronic liver disease and cirrhosis. *Curr Gastroenterol Rep*. 2012;14(1):67-73. Epub 2011/11/25.
69. Kitson MT, Roberts SK. D-livering the message: The importance of vitamin D status in chronic liver disease. *Journal of hepatology*. 2012;57(4):897-909.
70. Cholongitas E, Theocharidou E, Goulis J, Tsochatzis E, Akriviadis E, Burroughs K. Review article: the extra-skeletal effects of vitamin D in chronic hepatitis C infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(6):634-46. Epub 2012/02/10.
71. Zuniga S, Firrincieli D, Housset C, Chignard N. Vitamin D and the vitamin D receptor in liver pathophysiology. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2011;35(4):295-302. Epub 2011/03/29.
72. Gutierrez JA, Parikh N, Branch AD. Classical and emerging roles of vitamin D in hepatitis C virus infection. *Semin Liver Dis*. 2011;31(4):387-98. Epub 2011/12/23.
73. Lange CM, Bibert S, Kutalik Z, Burgisser P, Cerny A, Dufour JF, et al. A genetic validation study reveals a role of vitamin D metabolism in the response to interferon-alfa-based therapy of chronic hepatitis C. *Plos One*. 2012;7(7):e40159. Epub 2012/07/19.
74. Petta S, Camma C, Scazzone C, Tripodo C, Di Marco V, Bono A, et al. Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2010;51(4):1158-67. Epub 2010/02/18.

75. Finkelmeier F, Kronenberger B, Koberle V, Bojunga J, Zeuzem S, Trojan J, et al. Severe 25-hydroxyvitamin D deficiency identifies a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma - a prospective cohort study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(10):1204-12. Epub 2014/04/02.
76. Atsukawa M, Tsubota A, Shimada N, Yoshizawa K, Abe H, Asano T, et al. Effect of native vitamin D3 supplementation on refractory chronic hepatitis C patients in simeprevir with pegylated interferon/ribavirin. *Hepatology Res.* 2016;46(5):450-8. Epub 2015/08/21.
77. Grunhage F, Hochrath K, Krawczyk M, Hoblinger A, Obermayer-Pietsch B, Geisel J, et al. Common genetic variation in vitamin D metabolism is associated with liver stiffness. *Hepatology.* 2012;56(5):1883-91.
78. Lange CM, Miki D, Ochi H, Nischalke HD, Bojunga J, Bibert S, et al. Genetic analyses reveal a role for vitamin D insufficiency in HCV-associated hepatocellular carcinoma development. *PLoS One.* 2013;8(5):e64053. Epub 2013/06/05.
79. Gascon-Barre M, Demers C, Mirshahi A, Neron S, Zalzal S, Nanci A. The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells. *Hepatology.* 2003;37(5):1034-42. Epub 2003/04/30.
80. Petta S, Grimaudo S, Tripodo C, Cabibi D, Calvaruso M, Di Cristina A, et al. The hepatic expression of vitamin D receptor is inversely associated with the severity of liver damage in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2015;100(1):193-200. Epub 2014/10/01.
81. Barchetta I, Carotti S, Labbadia G, Gentilucci UV, Muda AO, Angelico F, et al. Liver vitamin D receptor, CYP2R1, and CYP27A1 expression: relationship with liver histology and vitamin D3 levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis or hepatitis C virus. *Hepatology.* 2012;56(6):2180-7. Epub 2012/07/04.
82. Abramovitch S, Dahan-Bachar L, Sharvit E, Weisman Y, Ben Tov A, Brazowski E, et al. Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Gut.* 2011;60(12):1728-37.
83. Abramovitch S, Sharvit E, Weisman Y, Bentov A, Brazowski E, Cohen G, et al. Vitamin D inhibits development of liver fibrosis in an animal model but cannot ameliorate established cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;308(2):G112-20. Epub 2014/09/13.
84. Reiter FP, Hohenester S, Nagel JM, Wimmer R, Artmann R, Wottke L, et al. 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ prevents activation of hepatic stellate cells in vitro and ameliorates inflammatory liver damage but not fibrosis in the Abcb4(-/-) model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;459(2):227-33. Epub 2015/02/26.

85. Potter JJ, Liu X, Koteish A, Mezey E. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its nuclear receptor repress human alpha(1) (I) collagen expression and type I collagen formation. *Liver Int.* 2013.
86. Falleti E, Bitetto D, Fabris C, Cussigh A, Fontanini E, Fornasiere E, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. *World J Gastroentero.* 2010;16(24):3016-24.
87. Hung CH, Chiu YC, Hu TH, Chen CH, Lu SN, Huang CM, et al. Significance of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms for Risk of Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C. *Transl Oncol.* 2014;7(4):503-7.
88. Beilfuss A, Sowa JP, Sydor S, Beste M, Bechmann LP, Schlattjan M, et al. Vitamin D counteracts fibrogenic TGF-beta signalling in human hepatic stellate cells both receptor-dependently and independently. *Gut.* 2015;64(5):791-9.
89. Ma J, Liu YC, Fang Y, Cao Y, Liu ZL. TGF-beta1 polymorphism 509 C>T is associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients. *Genetics and molecular research : GMR.* 2015;14(2):4461-8. Epub 2015/05/13.
90. Radwan MI, Pasha HF, Mohamed RH, Hussien HI, El-Khshab MN. Influence of transforming growth factor-beta1 and tumor necrosis factor-alpha genes polymorphisms on the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients. *Cytokine.* 2012;60(1):271-6. Epub 2012/06/12.
91. Mohy A, Fouad A. Role of transforming growth factor-beta1 in serum and - 509 C>T promoter gene polymorphism in development of liver cirrhosis in Egyptian patients. *Meta gene.* 2014;2:631-7. Epub 2015/01/22.
92. Brown JJ, Ollier W, Arscott G, Ke X, Lamb J, Day P, et al. Genetic susceptibility to keloid scarring: SMAD gene SNP frequencies in Afro-Caribbeans. *Experimental dermatology.* 2008;17(7):610-3. Epub 2008/05/01.
93. Bayat A, McGrouther DA. Spectrum of abnormal skin scars and their clinical management. *Br J Hosp Med (Lond).* 2006;67(10):527-32. Epub 2006/10/31.
94. Mailman MD, Feolo M, Jin Y, Kimura M, Tryka K, Bagoutdinov R, et al. The NCBI dbGaP database of genotypes and phenotypes. *Nature genetics.* 2007;39(10):1181-6. Epub 2007/09/28.
95. Tryka KA, Hao L, Sturcke A, Jin Y, Wang ZY, Ziyabari L, et al. NCBI's Database of Genotypes and Phenotypes: dbGaP. *Nucleic acids research.* 2014;42(Database issue):D975-9. Epub 2013/12/04.
96. Li Y, Willer C, Sanna S, Abecasis G. Genotype imputation. *Annual review of genomics and human genetics.* 2009;10:387-406. Epub 2009/09/01.

97. Howie B, Marchini J, Stephens M. Genotype imputation with thousands of genomes. *G3* (Bethesda). 2011;1(6):457-70. Epub 2012/03/03.
98. Marchini J, Howie B. Genotype imputation for genome-wide association studies. *Nature reviews Genetics*. 2010;11(7):499-511. Epub 2010/06/03.
99. Saad MN, Mabrouk MS, Eldeib AM, Shaker OG. Identification of rheumatoid arthritis biomarkers based on single nucleotide polymorphisms and haplotype blocks: A systematic review and meta-analysis. *Journal of advanced research*. 2016;7(1):1-16. Epub 2016/02/05.
100. Browning BL, Browning SR. Genotype Imputation with Millions of Reference Samples. *American journal of human genetics*. 2016;98(1):116-26. Epub 2016/01/11.
101. Howie BN, Donnelly P, Marchini J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS genetics*. 2009;5(6):e1000529. Epub 2009/06/23.
102. Li Y, Willer CJ, Ding J, Scheet P, Abecasis GR. MaCH: using sequence and genotype data to estimate haplotypes and unobserved genotypes. *Genetic epidemiology*. 2010;34(8):816-34. Epub 2010/11/09.
103. Liu EY, Li M, Wang W, Li Y. MaCH-admix: genotype imputation for admixed populations. *Genetic epidemiology*. 2013;37(1):25-37. Epub 2012/10/18.
104. Ellinghaus D, Schreiber S, Franke A, Nothnagel M. Current software for genotype imputation. *Human genomics*. 2009;3(4):371-80. Epub 2009/08/27.
105. The International HapMap Project. *Nature*. 2003;426(6968):789-96. Epub 2003/12/20.
106. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56-65. Epub 2012/11/07.
107. de Vries PS, Sabater-Lleal M, Chasman DI, Trompet S, Ahluwalia TS, Teumer A, et al. Comparison of HapMap and 1000 Genomes Reference Panels in a Large-Scale Genome-Wide Association Study. *PLoS One*. 2017;12(1):e0167742. Epub 2017/01/21.
108. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74. Epub 2015/10/04.
109. Lee WM, Dienstag JL, Lindsay KL, Lok AS, Bonkovsky HL, Shiffman ML, et al. Evolution of the HALT-C trial: pegylated interferon as maintenance therapy for chronic hepatitis C in previous interferon nonresponders. *Control Clin Trials*. 2004;25(5):472-92.
110. Di Bisceglie AM, Shiffman ML, Everson GT, Lindsay KL, Everhart JE, Wright EC, et al. Prolonged therapy of advanced chronic hepatitis C with low-dose peginterferon. *The New England journal of medicine*. 2008;359(23):2429-41. Epub 2008/12/05.

13 ANEXOS

13.1 Anexo I - Variáveis disponíveis do estudo HALT-C na plataforma dbGaP

Variable	Description	Coded values	Most Frequently Occurring Valid Values
LOGDROP2	Early virological response (EVR) ≥ 2 log decrease in HCV RNA by week 12	0=no 1=yes	no (488) yes (478)
HCVRNAP_W20	HCV RNA negative end of W20	0=no 1=yes	yes (584) no (311)
HCVRNAP_W48	HCV RNA negative end of W48	0=no 1=yes	no (260) yes (29)
HCC_PHCC_A	HCC developed	0=no 1=yes	no (636) yes (56)
fibro_ishak_s00	Ishak Fibrosis score at visit S00	0=absent 1=portal fibrotic expansion 2=portal fibrotic expansion 3=bridging fibrosis 4=bridging fibrosis 5=cirrhosis 6=cirrhosis	bridging fibrosis (code=3) (346) cirrhosis (code=5) (195) bridging fibrosis (174) cirrhosis (171) portal fibrotic expansion (77) portal fibrotic expansion (code=1) (1)
fibro_ishak_M24	Ishak Fibrosis score at visit M24	0=absent 1=portal fibrotic expansion 2=portal fibrotic expansion 3=bridging	bridging fibrosis (166) cirrhosis (129) bridging fibrosis (code=4) (91) cirrhosis (code=5) (90) portal fibrotic expansion (87) portal fibrotic expansion (code=1) (17)

		fibrosis 4=bridging fibrosis 5=cirrhosis 6=cirrhosis	
fibro_ishak_M48	Ishak Fibrosis score at visit M48	0=absent 1=portal fibrotic expansion 2=portal fibrotic expansion 3=bridging fibrosis 4=bridging fibrosis 5=cirrhosis 6=cirrhosis	cirrhosis (137) bridging fibrosis (136) cirrhosis (code=5) (73) portal fibrotic expansion (73) bridging fibrosis (code=4) (47) portal fibrotic expansion (code=1) (15) absent (1)
AGE	Age		51 (71) 45 (71) 46 (70) 48 (69) 47 (63) 49 (62) 50 (59) 53 (46) 44 (44) 52 (42)
GENDER	Gender	1=Male 2=female	Male (696) female (270)
RACE4	Race/ethnicity	1=Non-hisp white 2=Black 3=Hispanic 4=Other	Non-hisp white (721) Black (140) Hispanic (82) Other (23)
LIVER_REL	Death Liver related	-8=skipped 1=yes 2=no	yes (53) no (36) skipped (6)
DTH_A	Death all cause	0=no 1=yes	no (597) yes (95)
CTP_A	CTP >=7	0=no 1=yes	no (577) yes (115)
ASC_A	Ascites	0=no 1=yes	no (628) yes (64)
BPER_A	Spontaneous bacteria	0=no 1=yes	no (688) yes (4)

	peritonitis		
ENCE_A	Encephalopathy	0=no 1=yes	no (654) yes (38)
TRANS_A	Liver transplant	0=no 1=yes	no (636) yes (56)
TPI	Two point increase in Ishak Fibrosis score	0=no 1=yes	no (269) yes (102)
ESOPH_VAR	Esophageal varices baseline	0=no 1=yes	no (504) yes (166)
esoph_var_M24	Esophageal varices M24	0=no 1=yes	yes (127) no (35)
esoph_var_M48	Esophageal varices M48	0=no 1=yes	no (340) yes (196)
vprogr	Worsening of baseline varices	0=no 1=yes 2=M24 3=M48 4=VH 5=No M24 and M48 6=miss M24, no M48 7=NA 8=got worse 9=improved 10=same .=missing	NA (518) No M24 and M48 (84) M24 (29) M48 (14) VH (4) miss M24, no M48 (3)
portgast_BL	Portal gastropathy baseline	0=no 1=yes	no (419) yes (250)
portgast_M24	Portal gastropathy M24	0=no 1=yes	yes (113) no (49)
portgast_M48	Portal gastropathy M48	0=no 1=yes	yes (323) no (213)
pgastprogr61	Worsening of baseline PHG	0=no 1=yes 2=M24 3=M48 4=VH 5=No M24	NA (449) miss M24, no M48 (91) No M24 and M48 (63) M48 (28) M24 (16) VH (13)

		and M48 6=miss M24, no M48 7=NA 8=got worse 9=improve d 10=same . =missing	
HAI_IMP2_M24	HAI improved by 2+ S00 to M24	0=no 1=yes	no (398) yes (182)
HAI_IMP2_M48	HAI improved by 2+ S00 to M48	0=no 1=yes	no (308) yes (167)
RVR	TMA results non-reactive at wk 4	0=no 1=yes	no (95) yes (37)
liverdeath_trans	Liver deaths or transplant	0=no 1=yes	no (588) yes (104)
subjid	Subject ID		N/A
SVR	Patient type: SVR (negative wk72)	1=yes 2=no	no (822) yes (144)
breakthrough	Patient type: breakthrough	1=yes 2=no	no (936) yes (30)
relapse	Patient type: relapse	1=yes 2=no	no (866) yes (100)
randomized	Patient randomized into HALT-C trial	0=no 1=yes	yes (692) no (274)

ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/dbgap/studies/phs000430/phs000430.v1.p1/pheno_variable_summaries/phs000430.v1.pht003054.v1.p1.HALT_C_Subject_Phenotypes.var_report.xml

ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/dbgap/studies/phs000430/phs000430.v1.p1/pheno_variable_summaries/phs000430.v1.pht003054.v1.HALT_C_Subject_Phenotypes.data_dict.xml

13.2 Anexo II - Desfechos utilizados no artigo 2

Variáveis de controle

AGE

GENDER

RACE4

Piora da fibrose

TPI =1 (aumento de 2 pontos Ishak)

Descompensação hepática: ocorrência de qualquer uma das variáveis listadas abaixo

vprog = 4 (sangramento)

pgastrogr = 4 (sangramento)

CTP =1 (escore Child-Pugh-Turcotte ≥ 7)

ASC =1 (episódio de ascite)

BPER =1 (episódio de peritonite bacteriana espontânea)

ENCE =1 (episódio de encefalopatia hepática)

Morte relacionada ao fígado

liverdeath = 1 (morte do fígado (óbito ou transplante hepático))

Carcinoma hepatocelular

HCC =1 (surgimento de carcinoma hepatocelular)

Sangramento de varizes gastro-esofágicas: ocorrência de qualquer uma das variáveis listadas abaixo

vprog = 4 (sangramento)

pgastrogr = 4 (sangramento)

Escore Child-Pugh-Turcotte ≥ 7

CTP =1 (escore Child-Pugh-Turcotte ≥ 7)

Ascite

ASC =1 (episódio de ascite)

Peritonite bacteriana espontânea

BPER =1 (episódio de peritonite bacteriana espontânea)

Encefalopatia hepática

ENCE =1 (episódio de encefalopatia hepática)

13.3 Anexo III – Carta de aceite do Artigo 1

Your Submission

em@editorialmanager.com <em@editorialmanager.com>

2 de abril de 2017 09:43

Responder a: annalsofhepatology@medicasur.org.mx

Para: "Laura A. Azevedo" <laura.alencastro@ufrgs.br>

Ref.: Ms. No. ANNHEPATOL-D-16-00174R1

Effect of vitamin D serum levels and GC gene polymorphisms in liver fibrosis due to chronic hepatitis C.

Annals of Hepatology

Dear Dr. Azevedo,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Annals of Hepatology.

It was accepted on 04/02/2017.

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Thank you for submitting your work to this journal.

Sincerely,

Nahum

Prof. Nahum Méndez-Sánchez, MD, MSc, PhD, FACG, AGAF.

Editor in Chief

Annals of Hepatology

Comments from the Editors and Reviewers:

Manuscript accepted according to reviewers' comments.

13.4 Anexo IV – Submissão Artigo 2

Journal of Human Genetics - JHG-17-112 Receipt of New Paper

jhgeo <jhgeo@yokohama-cu.ac.jp>
Para: laura.alencastro@ufrgs.br

12 de março de 2017 23:50

12th Mar 2017

Dear Ms Azevedo,

We received your manuscript entitled "Genetic variants underlying vitamin D metabolism and VDR-TGF β -1-SMAD3 interaction may impact on HCV progression. A study based on dbGaP data from the HALT-C study." by Laura Azevedo, Ursula Matte, Themis Silveira, and Mário Álvares-da-Silva.

Your manuscript has been assigned the Paper #: JHG-17-112.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

<http://mts-jhg.nature.com/cgi-bin/main.plex?el=A1Bs3Csv7A7Pqu2F2A9ftd5kEFPawTNgEOgt2Kgj33EwZ>

Thank you for submitting your work to the Journal of Human Genetics.

Sincerely,

Journal of Human Genetics Editorial Office

14 APÊNDICES

14.1 Apêndice I - Passo-a-passo das análises genotípicas

O banco de genotipagem é disponibilizado em formato binário ped, que consiste de três arquivos de texto (bed, bim e fam). A grande maioria dos arquivos utilizados são arquivos de texto simples e podem ser abertos e editados em editor de texto. Todos os programas utilizados são rodados por linha de comando e foram utilizadas versões Windows ou Linux.

Arquivo.bed → arquivo com a informação da sequência de bases de cada indivíduo

*Este é o único arquivo que não é visualizável em formato texto.

Arquivo.fam → arquivo com colunas com as seguintes informações

Family ID: identificação da família do indivíduo (para o caso de estudos familiares)

Individual ID: número que identifica cada indivíduo

Paternal ID: número que identifica o pai

Maternal ID: número que identifica o pai

Sex: 1=homem; 2=mulher; outros=desconhecido

Phenotype: fenótipo do indivíduo: 1= não afetado; 2=afetado; 0 ou -9=missing

Arquivo.bim → arquivo com 6 colunas que identificam cada polimorfismo analisado:

Cromossomo

Número rs#

Distância genética em morgans

Posição em pares de base

Alelo 1 (referência)

Alelo 2

Os dados de genotipagem dos indivíduos do banco foram originalmente obtidos por sequenciamento, utilizando a plataforma Illumina Human610_Quadv1_B, que genotipou 617.431 polimorfismos em um total de 966 indivíduos.

Neste estudo foram, primeiramente, realizadas algumas atualizações e edições necessárias no banco baixado da plataforma dbGaP. Estas edições foram realizadas utilizando software Plink v1.07 em ambiente Windows.

1. Algumas das bases do arquivo binário se encontrava no sentido *reverse* (-) e precisaram ser atualizadas para o sentido *forward* (+). Esse passo é importante para que no momento da imputação, o sentido da fita da amostra esteja no mesmo sentido do painel de referência. Foram invertidos 306.621 SNPs para o sentido *forward*.
2. A versão da montagem do genoma (*genome assembly*) era NCBI36 e precisou ser atualizada para NCBI37, a mesma versão do painel de referência. Dessa forma a posição no cromossomo em pb fica a mesma para as duas populações.
3. Remoção dos SNPs A/T e C/G para evitar ambiguidade das fitas no momento da imputação. Foram excluídos 4.401 SNPs, ficando 613.030.
4. Para atualização destas informações foi utilizado o arquivo fonte específico para a plataforma Illumina Human610_Quadv1_B, que consta no site www.well.ox.ac.uk/~wrayner/strand.
5. Em seguida foram aplicados os seguintes filtros:
 - a. Filtro de amostra: remoção de indivíduos com anormalidades cromossômicas, inconsistência no sexo e aqueles com menos de 90% dos polimorfismos genotipados. Permaneceram 952 indivíduos.

- b. Filtros dos marcadores: exclusão dos SNPs com menos 97% de genotipagem na amostra (40.483), SNPS com $MAF < 0,01$ (36.792) e aqueles com desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 10^{-6}$) (15.019). Ficaram 550.275 SNPs.
6. Foi verificado, que dentre os 44 SNPs de interesse, 23 não constavam na amostra (Tabela 1A).

Tabela 1A: Polimorfismos que precisaram ser imputados.

Cromossomo	Gene	SNP
4	<i>GC</i>	rs115316390
		rs17467825
		rs222020
		rs2298850
		rs3755967
		rs4588
		rs221999
		rs10741657
11	<i>CYP2R1</i>	rs10766197
		rs7116978
		rs12785878
11	<i>DHCR7</i>	rs4945008
		rs4944957
		rs731236
12	<i>VDR</i>	rs7975232
		rs10877102
12	<i>CYP27B1</i>	rs10877102
15	<i>SMAD3</i>	rs9806504
		rs11071932
19	<i>TGFB1</i>	rs1800471
		rs1800469
20	<i>CYP24A1</i>	rs73913757
		rs17219315
		rs2244719

7. Foram criados arquivos separados, extraindo cada um dos cromossomos de interesse: 4, 11, 12, 15, 19 e 20.

A imputação dos polimorfismos de interesse foi feita com o programa Mach-Admix em sistema operacional Ubuntu. Previamente à imputação foi necessário preparar os arquivos da amostra e do painel de referência nos formatos adequados conforme instruções do desenvolvedor (<http://www.unc.edu/~yunmli/MaCH-Admix/tutorial.php#input>).

Amostra: formato MERLIN

Arquivo ped: arquivo contendo Family ID, Individual ID, Maternal ID, Paternal ID, Sexo e a dupla de alelos para cada polimorfismo.

Arquivo dat: lista de todos marcadores presentes no arquivo ped (rs#).

Painel de referência: formato vcf

Arquivo único que contém os haplótipos dos indivíduos da amostra referência.

1. Os arquivos de cada cromossomo da amostra foram convertidos nos formatos dat e ped.
2. O painel de referência utilizado foi do projeto 1000 Genome (ALL Phase 3 v.5), que contém 2504 indivíduos e aproximadamente 81.2M marcadores. Os arquivos do 1000G foram baixados em formato vcf para cada cromossomo. Utilizando o programa Java splitVCFref, cada cromossomo foi dividido em pedaços de 5Mb com flancos de 250kb em cada extremidade para otimizar o tempo de cada análise. O programa foi baixado do site do Mach-Admix, seguindo instruções do próprio desenvolvedor.
3. Os arquivos dos pedaços de cromossomo que continham os SNPs de interesse foram filtrados para remoção de mutações indels, para não interferir na imputação. A remoção de SNPs do arquivo vcf foi realizada com a versão beta do Plink (Plink v.2) em Windows.

4. A imputação foi rodada em modo integrado, que é o modo padrão do programa. Os parâmetros computacionais utilizados foram: --states 200, --imputestates 1000 e --rounds 50. O tempo médio de imputação por região cromossômica foi de 50.000 segundos (~15h). Comando genérico:

```
\mach-admix --d amostra.dat --p amostra.ped --h referência.vcf --vcreference --dosage --geno --probs --compact --autoflip --forceImputation --states 200 --imputestates 1000 --rounds 50 --o nomearquivofinal.out
```

5. São gerados quatro arquivos na imputação: info, erate, rec e geno.
6. Do arquivo info é retirada a informação sobre a qualidade e a frequência alélica dos SNPs imputados. A qualidade é medida pela correlação ao quadrado entre os genótipos imputados e os verdadeiros (R_{sq}). As variantes com $R_{sq} > 0,5$ foram consideradas adequadas. Polimorfismos com R_{sq} inferior a 0,5 foram excluídos.
7. Após análise da qualidade da imputação os dados foram convertidos novamente para arquivo em formato plink (bed, bim e fam) utilizando o software fcGENE 1.0.7 também em sistema operacional Ubuntu. Comando genérico:

```
\fcgene --mach-geno arquivoimputado.out.geno --mach-info arquivoimputado.out.info --format plink --out nomedoarquivofinal
```

8. Os polimorfismos imputados foram incorporados aos SNPs genotipados, gerando um arquivo único.
9. Para cada uma das variáveis de interesse foi realizada regressão logística no programa Plink. Os testes foram ajustados para idade, sexo e etnia. Foram testados os modelos de herança aditivo, dominante e recessivo.

Aditivo:	D	versus	d
Dominante:	DD, Dd	versus	dd

Recessivo: DD versus Dd, dd

D=alelo com menor frequência

10. Foram feitas correções de Bonferroni e FDR (False Discovery Rate). Comando genérico:

```
\plink --bfile nomearquivo --covar arquivodevariáveisparaajuste --pheno  
arquivocomosdefeschos --pheno-name nomedodesfecho --logistic --ci 0.95 --adjust --  
dominant
```