



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

JOSÉ CARLOS RODRIGUES NASCIMENTO

**POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEÍNA E NA CIRROSE HEPÁTICA INDUZIDA
PELO VÍRUS DA HEPATITE C COM OU SEM CARCINOMA HEPATOCELULAR NO
PERIOPERATÓRIO DE TRANSPLANTE ORTOTÓPICO DE FÍGADO**

FORTALEZA

2020

JOSÉ CARLOS RODRIGUES NASCIMENTO

**POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEÍNA E NA CIRROSE HEPÁTICA INDUZIDA
PELO VÍRUS DA HEPATITE C COM OU SEM CARCINOMA HEPATOCELULAR NO
PERIOPERATÓRIO DE TRANSPLANTE ORTOTÓPICO DE FÍGADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Médicas. Área de Concentração: Biomedicina.

Linha de Pesquisa: Patogêneses das doenças infecto inflamatórias.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N195p Nascimento, José Carlos Rodrigues.
POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEÍNA E NA CIRROSE HEPÁTICA INDUZIDA PELO
VÍRUS DA HEPATITE C COM OU SEM CARCINOMA HEPATOCELULAR NO
PERIOPERATÓRIO DE TRANSPLANTE ORTOTÓPICO DE FÍGADO / José Carlos
Rodrigues Nascimento. – 2020.
134 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

1. Apolipoproteína E. 2. Cirrose hepática. 3. Hepatite C. 4. Hepatocarcinoma. 5.
Transplante de fígado. I. Título.

CDD 610

JOSÉ CARLOS RODRIGUES NASCIMENTO

**POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEÍNA E NA CIRROSE HEPÁTICA INDUZIDA
PELO VÍRUS DA HEPATITE C COM OU SEM CARCINOMA HEPATOCELULAR NO
PERIOPERATÓRIO DE TRANSPLANTE ORTOTÓPICO DE FÍGADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Médicas. Área de Concentração: Biomedicina.

Aprovada em __/__/__.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Ivelise Regina Canítio Brasil (Membro Efetivo)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. James S. Owen (Membro Efetivo)
UCL Medical School, London, United Kingdom

Prof. Dr. Gustavo Rêgo Coêlho (Membro Efetivo)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Edmilson Ferreira de Oliveira Filho (Membro Efetivo)
Charité, Universitätsmedizin Berlin, Alemanha

DEDICATÓRIA

A **Deus**, por me dar força, saúde e dedicação a cada dia para que eu possa alcançar meus objetivos.

Aos meus **pais** (Cícero e Antônia) pelo exemplo de amor, honestidade e dedicação.

Aos meus **irmãos** (Cícero, Cinthia e Josefa) pela amizade e cumplicidade.

À Janaina, minha **esposa**, pelo apoio, incentivo, compreensão, paciência, amor e carinho, para a concretização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Reinaldo Barreto Oriá, pela orientação, por toda paciência, confiança e ensinamentos. Muito obrigado por sua disponibilidade, dedicação e atenção que foram fundamentais para a realização deste estudo.

Aos professores doutores Ivelise Regina Canítio Brasil, Gustavo Rêgo Coelho, James S. Owen, Edmilson Ferreira de Oliveira Filho e Paulo Goberlânio de Barros Silva por terem aceitado fazer parte da banca de defesa desse trabalho, contribuindo com seus conhecimentos para o desenvolvimento e aperfeiçoamento desse estudo.

Aos funcionários do ambulatório de transplante hepático do Hospital Geral de Fortaleza e do Hospital Universitário Walter Cantídio, em especial as enfermeiras Rosilene Barroso Jacobsen (HGF) e Maria José Nascimento Flor (HUWC) pelo apoio.

Aos Drs. Ivelise Regina Canítio Brasil e Paulo Everton Garcia Costa pelo incentivo.

Ao professor Dr. José Huygens Parente Garcia pelo apoio.

Ao estatístico Antônio Brazil Viana Júnior pela colaboração.

A toda equipe de alunos e pesquisadores da UFC que fizeram parte ao longo desses quatro anos de pesquisa, na coleta, extração de DNA e análises de genotipagem da apolipoproteína E (ApoE), realizadas no LABICONTE. Em especial a Lianna Cavalcante Pereira, Dulce Maria Nascimento Coelho, Juliana Magalhães da Cunha Rêgo e Naftanael Alves Ricarte.

Aos colegas da pós-graduação, alunos de iniciação científica e todos que fizeram ou ainda fazem parte da família LABICONTE: Lianna Cavalcante Pereira, Kildere Marques Canuto, Cristhyane Costa de Aquino, Leonardo Lobo Saraiva Barros, Raul Sousa Freitas, Gabriella Araújo Matos, Naftanael Alves Ricarte, Ana Carolina Benicio alves, Dulce Maria Nascimento Coelho, Daniel Vieira Pinto, Robson Salviano de Matos, Juliana Magalhães da Cunha Rêgo, Fátima Virgínia Gama Justi, Juan de Sá Roriz Caminha, Cássia Rodrigues Roque, Silvio Alencar Cândido Sobrinho, André Penha Aguiar, Claudiane Carvalho Bessa e Ronaldo Pereira Dias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, incluindo todos os professores, principalmente aqueles que tive oportunidade de ter sido aluno na pós-graduação, e seus funcionários como as secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – PPGCM, Ivone Fontenele e Rita de Cássia. Também agradeço aos funcionários do Centro de Biomedicina, José Amadeus, Terezinha Rodrigues, Jéferson dos Santos e Cláudia Mateus.

Aos professores membros da banca examinadora, da qualificação e da defesa da tese, que tanto contribuíram para melhorias e ajustes deste trabalho, para que seja alcançada uma qualidade ainda maior do trabalho acadêmico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro ao LABICONTE para condução de atividades como a extração de DNA e análise de PCR.

Aos pacientes do Grupo de Transplante Hepático do Hospital Universitário Walter Cantídio e Hospital Geral de Fortaleza, que tornaram possível a realização desta pesquisa.

A todos aqueles que não foram citados e que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

Introdução: A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) pode resultar em inflamação crônica do fígado, que pode causar doença hepática terminal e carcinoma hepatocelular (HCC). A apolipoproteína E (proteína = ApoE, gene = APOE), que é principalmente sintetizada no fígado, é um participante fundamental no metabolismo do colesterol. Os polimorfismos da APOE podem influenciar o dano hepático induzido pelo HCV. Portanto, investigamos se alelos específicos da apolipoproteína E estão associados a diferentes desfechos em pacientes infectados pelo HCV com cirrose hepática associada ou não ao HCC em uma população brasileira. **Métodos:** Um total de 179 pacientes, de ambos os sexos, com idades entre 34 e 70 anos, foram incluídos antes ou após (até 10 anos de seguimento) do transplante ortotópico de fígado (TOF). A gravidade da doença hepática foi avaliada utilizando diferentes critérios, incluindo os critérios de Milão, METAVIR, MELD, Child-Pugh e níveis plasmáticos de alfa-fetoproteína. Os polimorfismos da APOE foram analisados por qRT-PCR. **Resultados:** O alelo APOE3 foi o alelo mais comum (67,3%), enquanto a frequência de APOE2 foi surpreendentemente alta nessa população (17,1%). O genótipo 1 do HCV foi o mais prevalente (61,9%). A severidade da inflamação das biópsias de 89 explantes do TOF e 2 pacientes no pré-transplante foi menos frequente em portadores de APOE4 (\leq A2F4, 87,9% versus A3F4, 12,1%, $p=0,002$) e extrema (A1F4, 71,1% versus A3F4, 28,9 %, $p=0,007$). Esses resultados também foram significantes naqueles pacientes portadores do APOE4, com doença hepática menos grave (MELD \leq 25), quando comparados a aqueles não APOE4 conforme o escore de METAVIR (\leq A2F4, 88.9% versus A3F4, 11.1%; $p=0.004$) and METAVIR extremo escores (A1F4, 73.0% versus A3F4, 27.0%; $p=0.012$). O grau de fibrose de biópsias do enxerto hepático de 91 pacientes pós-TOF, que apresentaram alterações clínicas e laboratoriais de rejeição ou recidiva do HCV, nos não-E4, foi moderadamente alto (F2) ($p=0,006$). **Conclusão:** Nossos achados apoiam ainda mais a proteção da APOE4 contra cirrose hepática induzida por HCV, em uma população brasileira, com presença de fibrose e inflamação hepática. Além disso, o APOE2 foi super-representado nessa amostra, sugerindo que os portadores de E2 apresentam risco aumentado e resultados desfavoráveis em pacientes com cirrose crônica por HCV.

Palavras-chaves: Apolipoproteína E; Cirrose hepática; Hepatite C; Hepatocarcinoma; Transplante de fígado.

ABSTRACT

Introduction: Hepatitis C virus (HCV) infection is responsible for a chronic liver inflammation, that may cause life-threatening end stage liver disease and carcinoma hepatocellular (HCC). Apolipoprotein E (protein=ApoE, gene=APOE), which is mainly synthesized in the liver, is a key player in cholesterol metabolism. APOE polymorphisms may influence HCV-induced liver disease. Therefore, we investigated whether specific apolipoprotein E alleles were associated with different outcomes in HCV-infected patients with liver cirrhosis associated or not with HCC in a Brazilian population. **Methods:** A total of 179 patients, both genders, aged 34-70 years, were included before or after (up to 10 years follow-up) orthotopic liver transplantation (OLT). Liver injury severity was assessed using different criteria, including Milan, METAVIR, MELD, Child's-Pugh and alpha-fetoprotein serum levels. APOE polymorphisms were analyzed by qRT-PCR. **Results:** The APOE3 allele was the most common allele (67.3%). HCV genotype 1 was the most prevalent (61.9%). APOE2 frequency was found surprisingly high in this population (17.1%). The inflammation severity of biopsies from 89 OLT explants and 2 patients in the pre-transplant was less frequent in APOE4 carriers (\leq A2F4, 87.9% versus A3F4, 12.1%, $p=0.002$), and extreme (A1F4, 71.1% versus A3F4, 28.9%, $p=0.007$). These results were also significant in those patients APOE4 positive carriers, with less severe liver disease (MELD \leq 25), when compared to APOE4 negative patients based on METAVIR (\leq A2F4, 88.9% versus A3F4, 11.1%; $p=0.004$) and METAVIR extreme scores (A1F4, 73.0% versus A3F4, 27.0%; $p=0.012$). The fibrosis degree of the liver graft biopsies of 91 post-TOF patients, who evolved with clinical and laboratory rejection changes, the lack of E4 allele associated with higher moderate fibrosis (F2) ($p=0.006$). **Conclusion:** Our findings further support the APOE4 protection against HCV-induced liver cirrhosis in a Brazilian population and related hepatic fibrosis and inflammation. In addition, the APOE2 was over-represented in this HCV sample, suggesting that E2 carriers show increased risk and worse outcomes following HCV.

Keywords: Apolipoprotein E; Liver cirrhosis; Hepatitis C; carcinoma hepatocellular; Liver transplantation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativa de prevalência do HCV em todos os países do globo no final de 2015.....	19
Figura 2 - Taxa de detecção (1) de casos de hepatite C segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2007 a 2017.....	20
Figura 3 - Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo faixa etária e sexo. Brasil, 2017.....	21
Figura 4 - Coeficiente de mortalidade por hepatite C segundo região de residência e ano do óbito.....	21
Figura 5 - Taxa de incidência/detecção de hepatites virais segundo agente etiológico e ano de notificação. Brasil, 2007 a 2017.....	22
Figura 6 - Distribuição dos óbitos por causa básica e associada às hepatites virais segundo agente etiológico. Brasil, 2000 a 2016.....	23
Figura 7 - História natural após infecção pelo vírus da hepatite C ácido ribonucleico (RNA).....	24
Figura 8 - Estrutura do vírus da hepatite C.....	25
Figura 9 - Genoma do Flaviviridae.....	26
Figura 10 - Características macroscópicas do fígado cirrótico.....	31
Figura 11 - Equipamento Fibroscan e o princípio de funcionamento da elastografia transitória.....	34
Figura 12 - Aspecto macroscópico do carcinoma hepatocelular avançado.....	39
Figura 13 - Sistema de estadiamento da Barcelona Clinic Liver Cancer.....	42
Figura 14 - Recomendações de tratamento conforme os estágios da Barcelona Clinic Liver Cancer.....	43
Figura 15 - Imagem de ressecção do fígado cirrótico e do fígado transplantado.....	45

Figura 16 - Estrutura tridimensional de regiões de ApoE destacando diferenças de isoformas.....	49
Figura 17 - Concentração isoelétrica de VLDL delipidada que mostra os três fenótipos de ApoE homozigotos: E2/2, E3/3 e E4/4.....	50
Figura 18 - Comparação dos efeitos da ApoE3 e ApoE4 na infecção pelo HCV nos hepatócitos.....	51
Figura 19 - Fluxograma de participação no estudo.....	57
Figura 20 - Distribuição dos pacientes do pré- e pós-TOF imediato, e seguimento até 10 anos após o TOF.....	59
Figura 21 - Análises de correlação de Spearman (r) entre MELD e variáveis de pacientes cirróticos com ou sem alelos E2 e E4.....	76
Figura 22 - Seguimento de fibrose hepática no pós-TOF conforme os alelos E2 e E4.....	77
Figura 23 - Seguimento por métodos não invasivos (APRI e FIB4) de pacientes no pós-TOF conforme os alelos E2 e E4.....	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - AADs pangenotípicos disponíveis para o tratamento de pacientes infectados pelo HCV sem cirrose.....	30
Quadro 2 - AADs pangenotípicos disponíveis para o tratamento de pacientes infectados pelo HCV com cirrose compensada.....	30
Quadro 3 - índice da relação de aspartato aminotransferase (AST) sobre plaquetas (APRI).....	36
Quadro 4 - Fibrosis-4 (FIB4), índice para fibrose hepática.....	36
Quadro 5 - Cálculo do escore de MELD.....	38
Quadro 6 - Critérios de estágio de diagnóstico recomendado pela American Association for the Study of Liver Diseases.....	41
Quadro 7 - Estadiamento conforme a classificação de Barcelona Clinic Liver Cancer.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Indicações para o tratamento da hepatite C crônica em 2015.....	28
Tabela 2 -	Antivirais de ação direta (AADs) conforme a classe.....	29
Tabela 3 -	Classificação de METAVIR conforme a atividade histológica e Fibrose.....	33
Tabela 4 -	Correlação do score de METAVIR com as medidas em kPa e m/s.....	34
Tabela 5 -	Descrição de fibrose hepática de acordo com valores de APRI e FIB4.....	37
Tabela 6 -	Classificação Modificada Child-Pugh.....	37
Tabela 7 -	Sequência de primers da APOE humana.....	62
Tabela 8 -	Perfil demográfico e clínico dos pacientes candidatos a TOF conforme a estratificação dos alelos E2 e E4.....	66
Tabela 9 -	Características clínicas e histológica do carcinoma hepatocelular dos pacientes candidatos a TOF conforme a estratificação dos alelos E2 e E4.....	67
Tabela 10 -	Distribuição genotípica e alélica da apolipoproteína E de acordo com a etiologia da cirrose, sorologia para HCV e carga viral da população total.....	68
Tabela 11 -	Pacientes tratados com terapia antiviral para HCV infecção no pré ou pós-TOF, e escore de METAVIR para estadiamento da inflamação no pré-TOF; em ambos os dados conforme a estratificação dos alelos E2 e E4.....	70
Tabela 12 -	Associação do escore Child-Pugh e variáveis em pacientes pré-TOF de acordo com o alelo E2.....	72
Tabela 13 -	Associação do escore Child-Pugh e variáveis em pacientes pré-TOF de acordo com o alelo E4.....	73

Tabela 14 -	Associação do escore MELD e variáveis em pacientes pré-TOF de acordo com os alelos E2 e E4.....	74
--------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HCV	Vírus da hepatite C
SIM	Sistema de Informação de Mortalidade
RNA	Ácido ribonucleico
TOF	Transplante ortotópico de fígado
ORF	Região aberta de leitura
NCRs	Locais não codificantes
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
PCR	Reação em cadeia de polimerase
TMA	Transcrição mediada por amplificação
HCC	Carcinoma hepatocelular
AADs	Antivirais de ação direta
FDA	Food and Drug Administration
EMA	European Medicines Agency
OMS	Organização mundial de saúde
SVR	Resposta virológica sustentada
VHB	Vírus da hepatite B crônica
kPa	kilo Pascals
APRI	índice da relação de aspartato aminotransferase (AST) sobre plaquetas
AST	Aspartato aminotransferase
FIB4	Fibrosis-4 score

ALT	Alanina aminotransferase
MELD	Model for End-Stage Liver Disease
TP	Tempo de protrombina
TIPS	Shunt portossistêmico intra-hepático via transjugular
UNOS	Rede Unida para Compartilhamento de Órgãos
INR	International normalized ratio
AFP	Alfa-fetoproteína
TC	Tomografia computadorizada
RNM	Ressonância nuclear magnética
PS	Estatus de desempenho
APOE	Apolipoproteína E
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
LDR-R	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
IL-2	Interleucina-2
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LCR	Líquido cefalorraquidiano
HSPGs	Proteoglicanas de heparan sulfato
LVP	Partícula lipoviral
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica
SR-BI	Receptores de eliminação B1

PDGF-BB	Fator de crescimento derivado de plaquetas BB
TGF β	Fator de crescimento transformador β
HGF	Hospital Geral de Fortaleza
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNase	Ribonuclease
LABICONTE	Laboratório de Biologia da Cicatrização, Ontogenia e Nutrição de Tecidos
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time
Ct	Limiar do ciclo
OR	Odds ratio
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Infecção hepática por vírus da hepatite C.....	19
1.1.1	Epidemiologia e impacto da infecção por HCV na população.....	19
1.1.2	Agente etiológico, morfologia e estrutura do HCV.....	24
1.1.3	Diagnóstico e tratamento do HCV.....	26
1.2	Cirrose hepática por vírus da hepatite C.....	30
1.2.1	Estadiamento e prognóstico da cirrose hepática.....	32
1.3	Carcinoma hepatocelular	38
1.3.1	Epidemiologia e fatores de riscos.....	38
1.3.2	Rastreamento e diagnóstico.....	39
1.3.3	Estadiamento e tratamento.....	41
1.4	Transplante ortotópico de fígado.....	44
1.5	Apolipoproteína E.....	47
1.5.1	Apolipoproteína E, e HCV, TOF e HCC.....	51
1.5.2	Papel da Apolipoproteína E na fibrose do fígado	53
1.6	Justificativa	55
2	OBJETIVOS	56
2.1	Geral	56
2.2	Específicos	56
3	MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1	Delineamento e população do estudo.....	57

3.3	Coleta e análise de dados	58
3.3.1	Anamnese	58
3.3.2	Dados coletados dos prontuários	58
3.3.3	Estadiamento do grau de fibrose hepática no pós-TOF.....	60
3.3.4	Polimorfismo genético	61
3.3.5	Análises estatísticas	64
3.3.6	Considerações éticas	64
4	RESULTADOS	65
4.1	Perfil demográfico e clínico	65
4.1.1	Análise estatística de dados do pré-TOF de toda a população	65
4.1.2	Análise estatística de dados do pós-TOF.....	77
5	DISCUSSÃO.....	79
6	CONCLUSÃO.....	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
	ANEXOS.....	102
	MANUSCRITOS.....	110

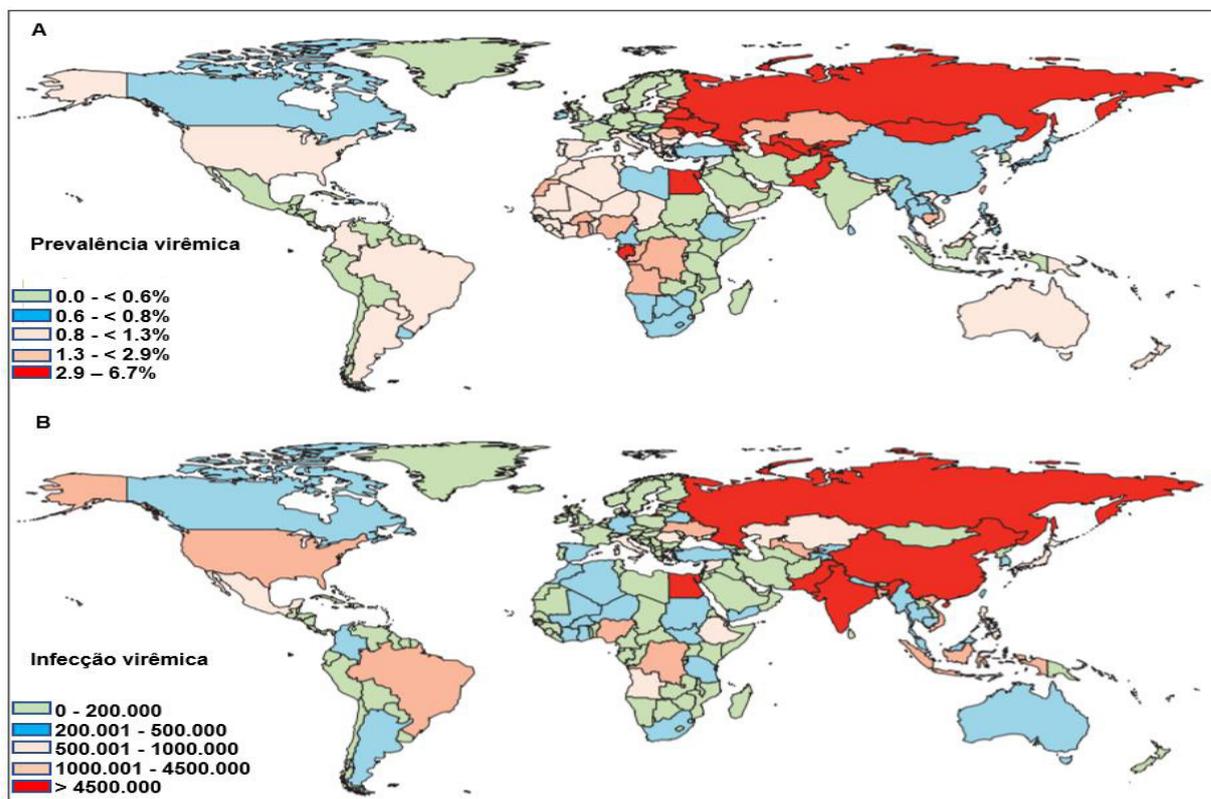
1. INTRODUÇÃO

1.1. Infecção hepática por vírus da hepatite C

1.1.1. Epidemiologia e impacto da infecção por HCV na população

Hepatite C é a inflamação do fígado decorrente de infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), com transmissão através da exposição ao sangue contaminado ou transmissão sexual ou através do compartilhamento de agulhas e seringas entre usuários de drogas injetáveis e de forma vertical (FAUTEUX-DANIEL *et al.* 2017; WESTBROOK AND DUSHEIKO, 2014). Levantamentos recentes estimam que em torno de 185 milhões de pessoas estão infectadas com o HCV no mundo, e que por volta de 657 mil pessoas estejam cronicamente infectadas (GOWER *et al.*, 2014; CENTER FOR DISEASE ANALYSIS, 2017; CONITEC, 2018). A prevalência e o número de infecções decorrente do HCV, incluindo todos os países do mundo, foi superior no continente Asiático (**Figuras 1A and B**) (POLARIS OBSERVATORY HCV COLLABORATORS, 2015).

Figura 1. Estimativa de prevalência do HCV em todos os países do globo em 2015.

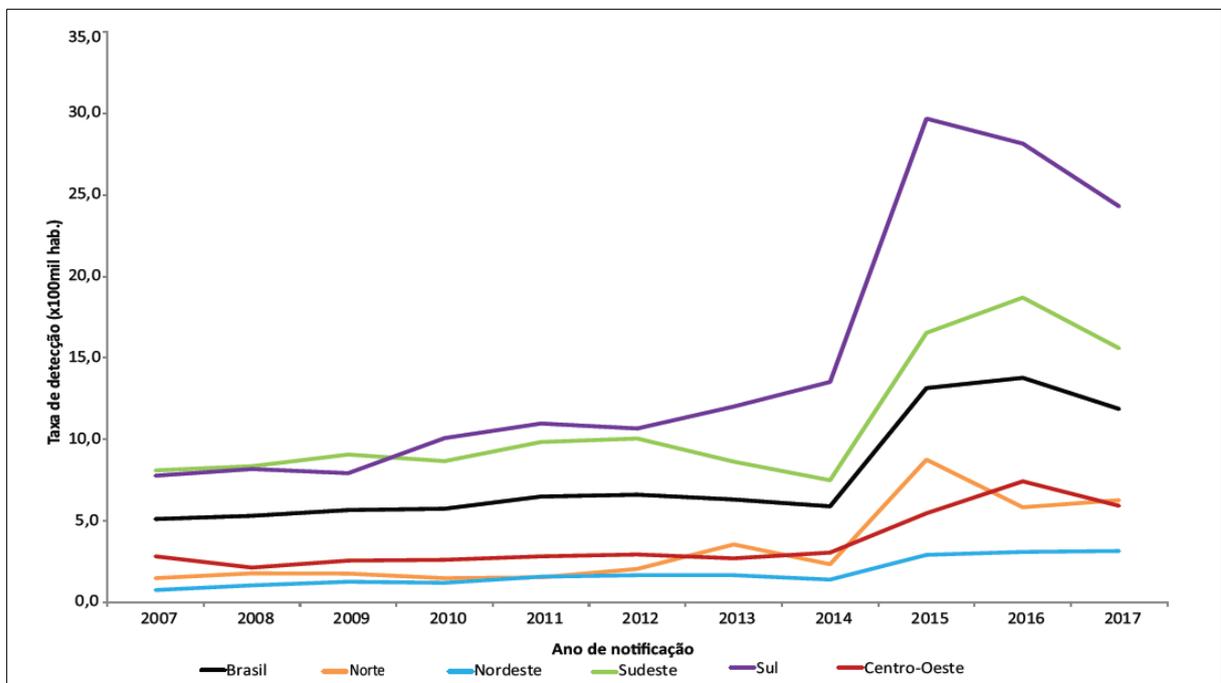


Prevalência virêmica em todos os países (A) e número de pessoas virêmicas infectadas em todos os países (B).

Fonte: POLARIS OBSERVATORY HCV COLLABORATORS, 2015.

De acordo com os dados de 1999 a 2017, no Brasil, autoridades sanitárias identificaram e notificaram 331.855 casos de hepatite C, através dos marcadores (anti-HCV reagente ou HCV-RNA detectável). No entanto, quando consideraram ambos os marcadores (anti-HCV reagente e HCV-RNA detectável), de 2007 a 2017, identificaram 160.105 casos, sendo 63,2% no Sudeste, 25,2% no Sul, 5,9% no Nordeste, 3,2% no Centro-Oeste e 2,5% no Norte (**Figura 2**). A partir de 2015, passou-se a não ser necessário considerar esses dois marcadores reagentes para notificação de hepatite C, sendo suficiente apenas um deles (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018).

Figura 2. Taxa de detecção (1) de casos de hepatite C segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2007 a 2017.



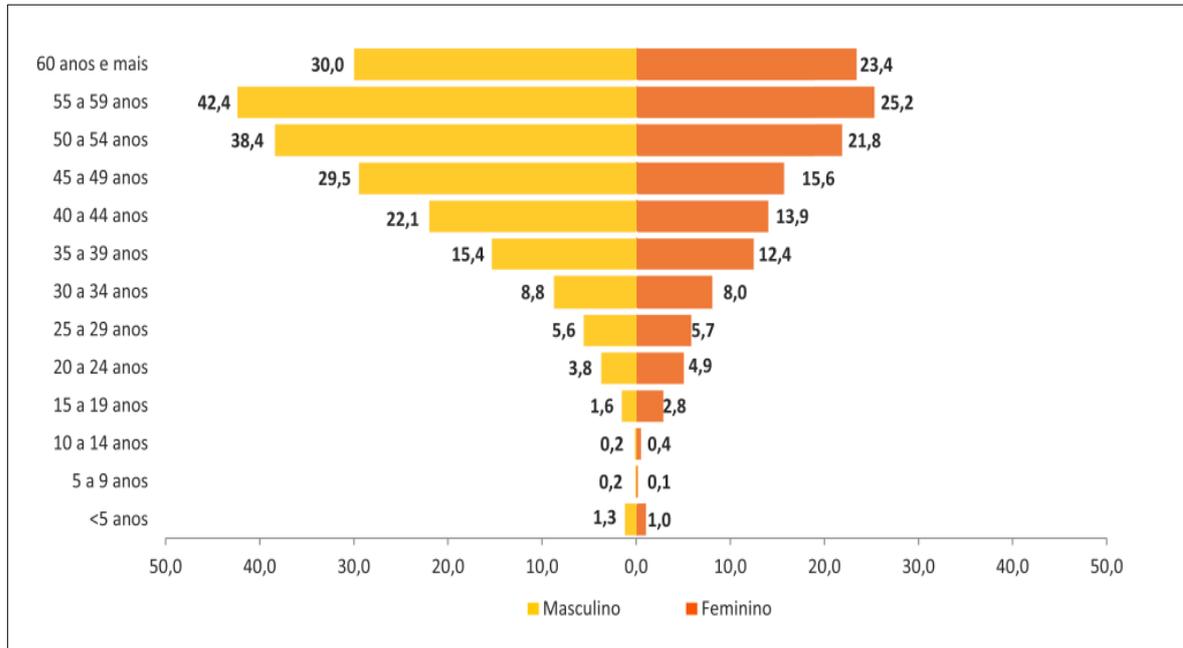
Fonte: Sistema de informação de agravos de notificação / Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde.

NOTA: (1) Até 2014 eram considerados casos confirmados de hepatite C aqueles com ambos os testes anti-HCV e HCV-RNA reagentes; em 2015, modificaram para pelo menos um dos testes anti-HCV ou HCV-RNA reagente.

Em 2017, a maior taxa de detecção de HCV foi na faixa etária de 55 a 59 anos, sendo 42,4 casos por 100 mil habitantes nos homens e 25,2 nas mulheres (**Figura 3**). A mortalidade por hepatite C é superior entre as hepatites virais. Entre 2006 a 2016, O Sul (1,7 por 100.000 habitantes) e Sudeste (1,2) foram as regiões brasileiras que

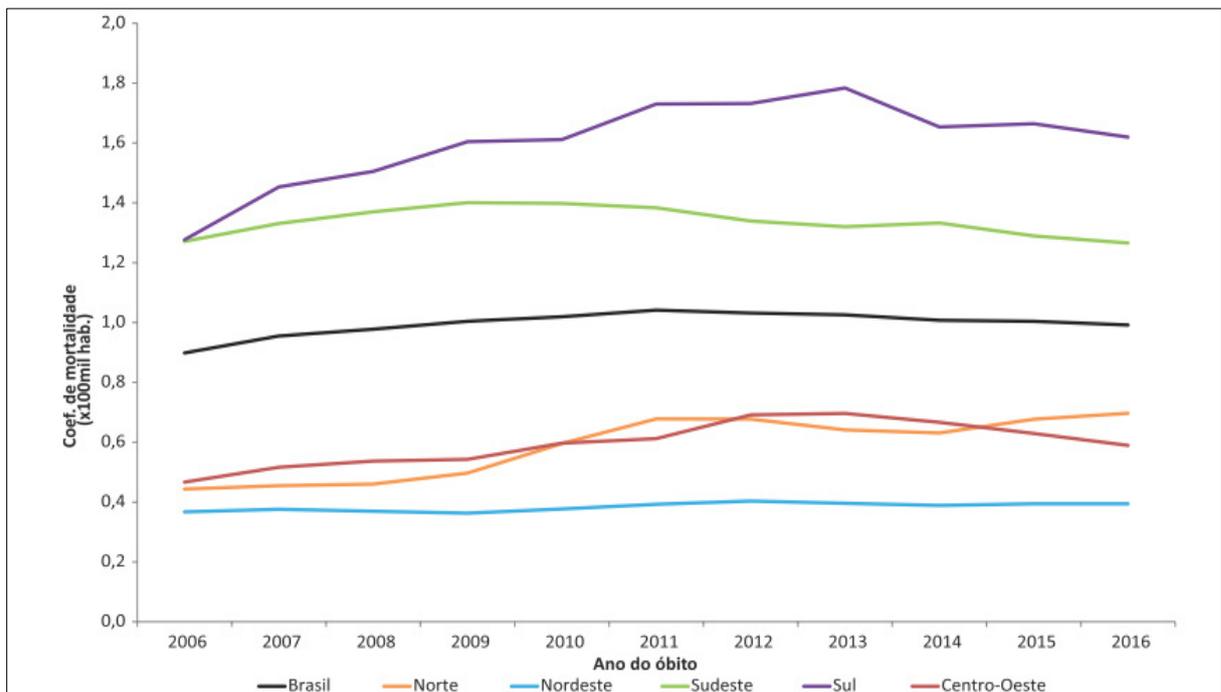
apresentaram os maiores coeficientes de mortalidade (**Figura 4**) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018).

Figura 3. Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo faixa etária e sexo. Brasil, 2017.



Fonte: Sistema de informação de agravos de notificação / Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde.

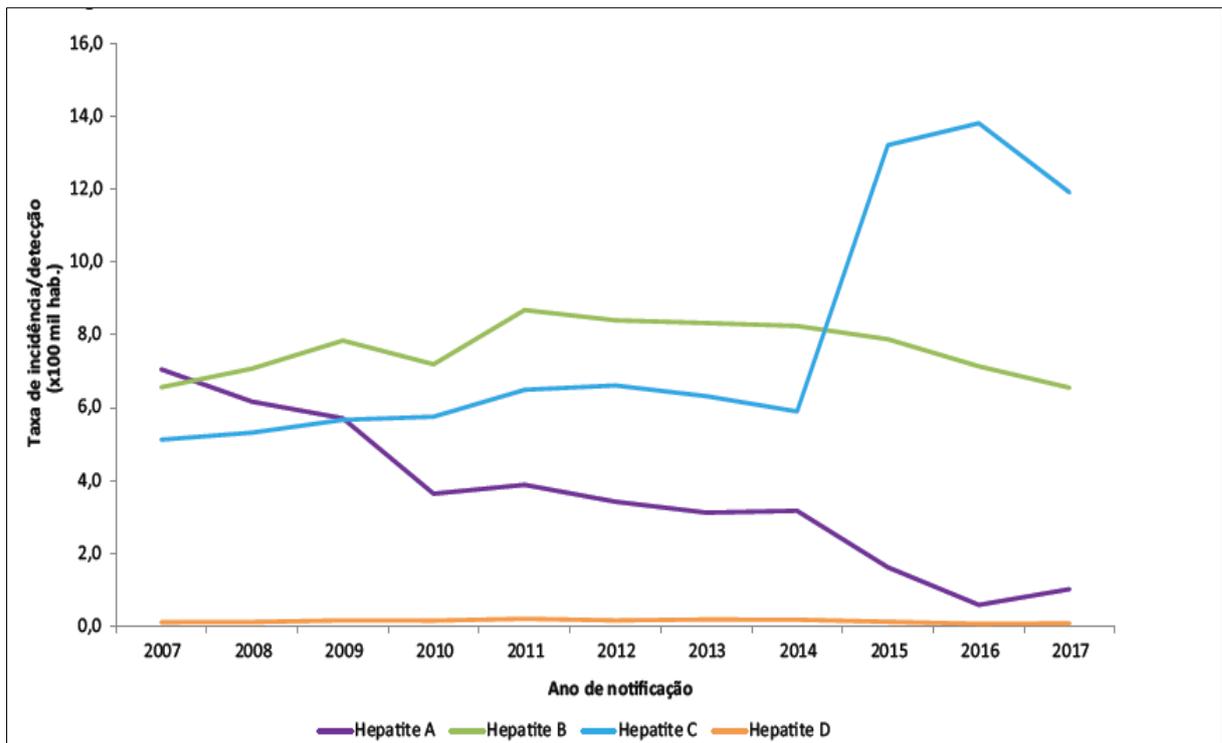
Figura 4. Coeficiente de mortalidade por hepatite C segundo região de residência e ano do óbito.



Fonte: Sistema de informação de agravos de notificação / Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde.

A taxa de incidência de hepatite A foi superior a taxa de incidência das demais etiologias como (B, C e D), no Brasil, em 2007. No entanto, no período de 2007 a 2016, enquanto houve diminuição da incidência de hepatite A, as taxas das hepatites B e C aumentaram, sendo que a taxa de hepatite C ultrapassou a taxa da B a partir de 2015. A hepatite D apresentou as menores taxas em todo o período (**Figura 5**) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018).

Figura 5. Taxa de incidência/detecção de hepatites virais segundo agente etiológico e ano de notificação. Brasil, 2007 a 2017.

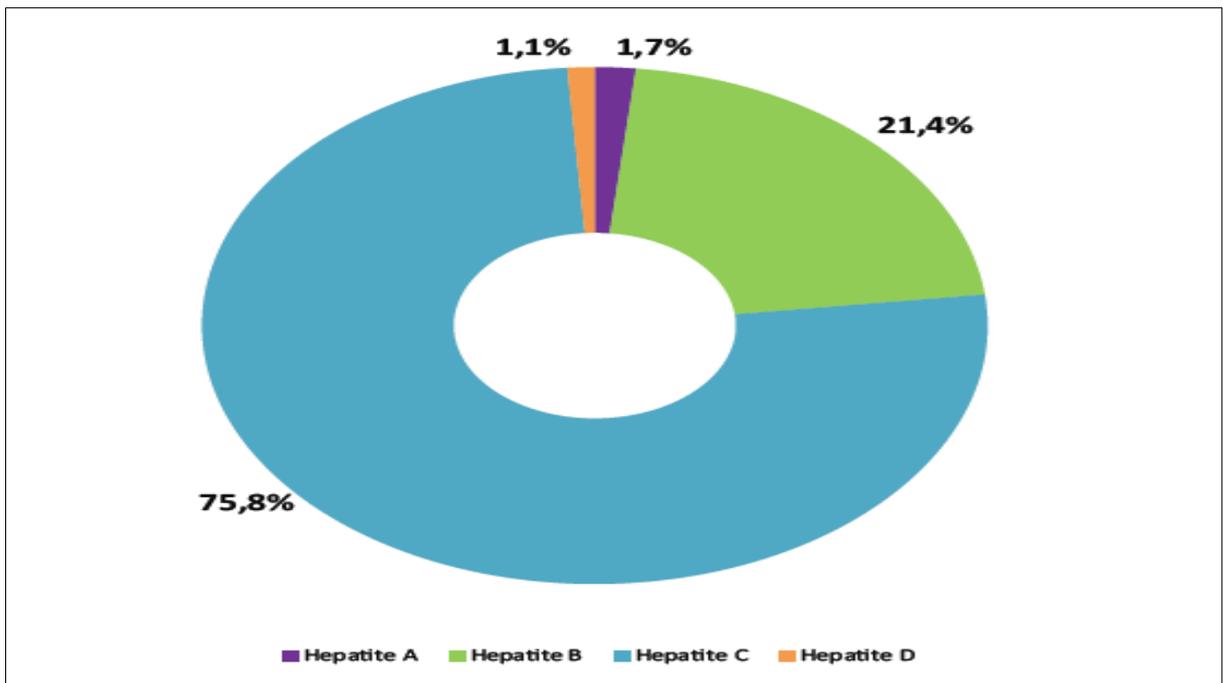


Fonte: Sistema de informação de agravos de notificação / Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde.

A hepatite C é responsável pela maioria dos óbitos por hepatites virais no Brasil. De 2000 a 2016, através do Sistema de Informação de Mortalidade (SIM), foram levantados 66.196 óbitos, no Brasil, associadas às hepatites virais como A, B, C e D. Sendo, 1,7% decorrente da hepatite A; 21,4% da hepatite B; 75,8% da hepatite C e 1,1% da hepatite D (**Figura 6**). A evolução da hepatite C aguda para crônica ocorre quando a infecção pelo HCV se prolonga por mais de seis meses, sendo comum em até 80% dos casos. Sem sintomas característicos, evolui lentamente, durante anos, podendo em torno de 20% dos infectados cronicamente progredir para cirrose, e de 1% a 5% para carcinoma hepatocelular (HCC). A hepatopatia crônica decorrente do HCV é a principal indicação de transplante ortotópico de fígado (TOF) no mundo. Em

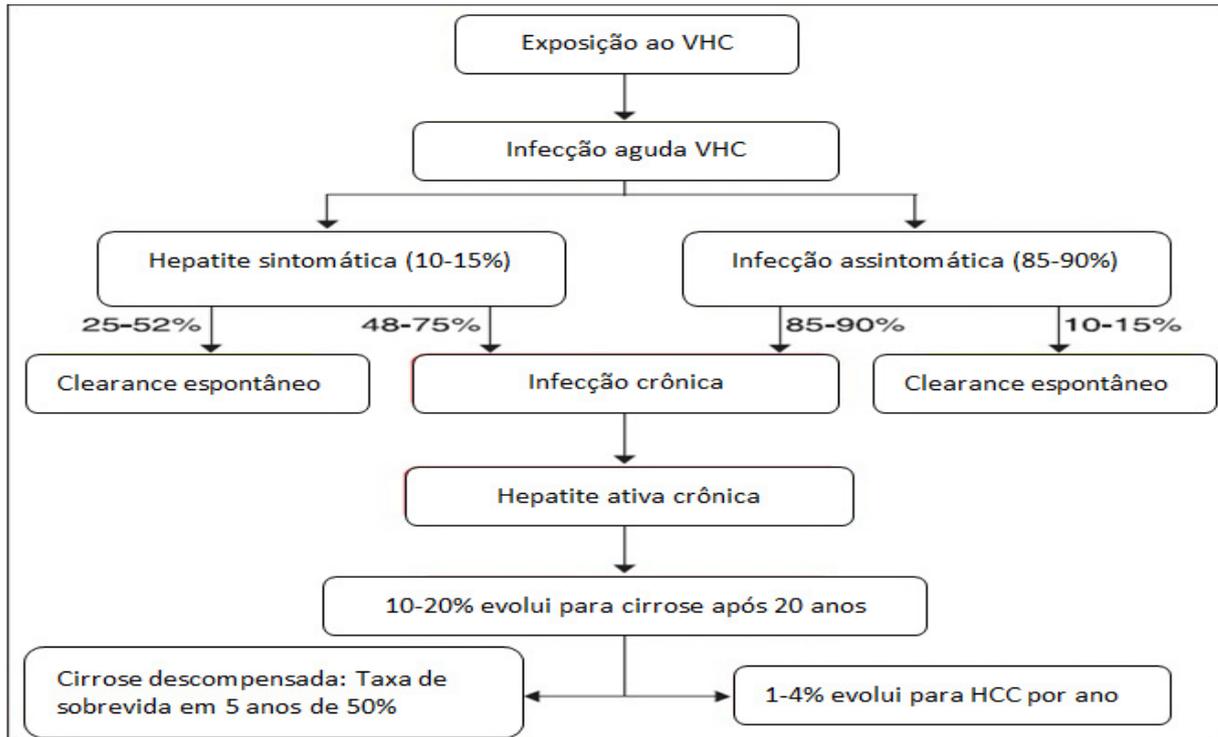
pacientes transplantados hepáticos, antes do tratamento da infecção do HCV com os antivirais de ação direta (AADs), a recorrência da hepatite C era acentuada e a maioria dos pacientes progredia rapidamente para cirrose e perda do enxerto. Veja a **Figura 7**, que descreve a história natural após infecção pelo vírus da hepatite C (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018; GUPTA et al., 2014; TOSHIKUNI *et al.*, 2014).

Figura 6. Distribuição dos óbitos por causa básica e associada às hepatites virais segundo agente etiológico. Brasil, 2000 a 2016.



Fonte: Sistema de informação de agravos de notificação / Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde.

Figura 7. História natural após infecção pelo vírus da hepatite C.



Fonte: Adaptado de GUPTA et al., 2014.

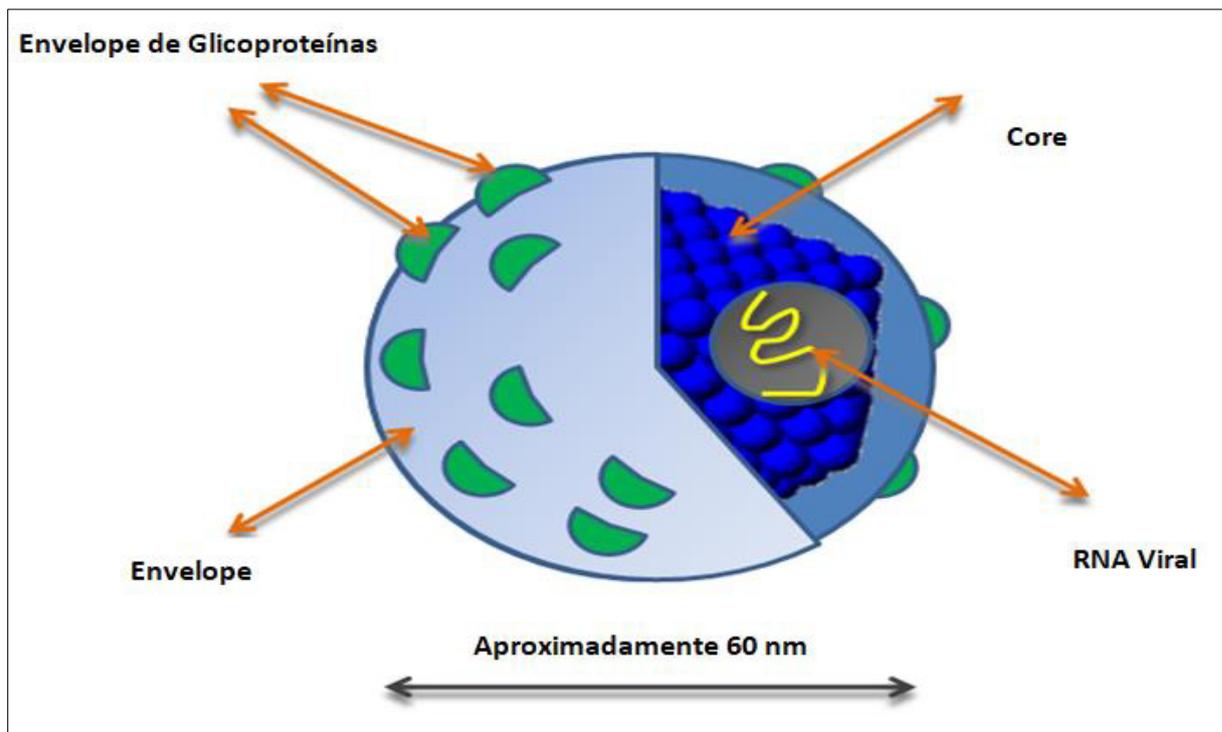
1.1.2. Agente etiológico, morfologia e estrutura do HCV

O HCV foi descoberto em 1988 e tem origem do gênero Hepacivírus, família Flaviviridae. Sua estrutura genômica é constituída por uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA), com cerca de 9.600 nucleotídeos e apresenta polaridade positiva (KREKULOVÁ *et al.*, 2006; SIMMONDS *et al.*, 2017). Há em torno de 7 genótipos e 67 subtipos do HCV (SMITH *et al.*, 2014).

Os tratamentos com antivirais orais de ação direta são efetivos em determinados genótipos que em outros. Contudo, é recomendado identificar o tipo do genótipo antes do tratamento. Os genótipos 1 e 3 são os mais prevalentes no mundo nas infecções por HCV (44% e 25%, respectivamente), seguidos pelo genótipo 4 (15%) (MESSINA *et al.*, 2015; POLARIS OBSERVATORY HCV COLLABORATORS, 2017; WHO, 2016). No Brasil, autores têm levantado que o genótipo 1 é o mais frequente, seguido pelos genótipos 3 e 2, e depois com menor prevalência, os genótipos 4 e 5 (CONITEC, 2018; FREITAS *et al.*, 2014; HOLZMANN *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2013).

O vírion da hepatite C tem estrutura esférica com um envelope lipídico contendo glicoproteínas e um único capsídeo proteico (**Figura 8**). O genoma tem 40 a 60 nm e cerca de 9.0-13 Kb de RNA não segmentado de sentido positivo. A replicação do genoma ocorre no citoplasma em combinação com membranas celulares modificadas, através da síntese de intermediários de cadeia negativa. As partículas virais são conduzidas através de vesículas (SIMMONDS *et al.*, 2017).

Figura 8. Estrutura do vírus da hepatite C.

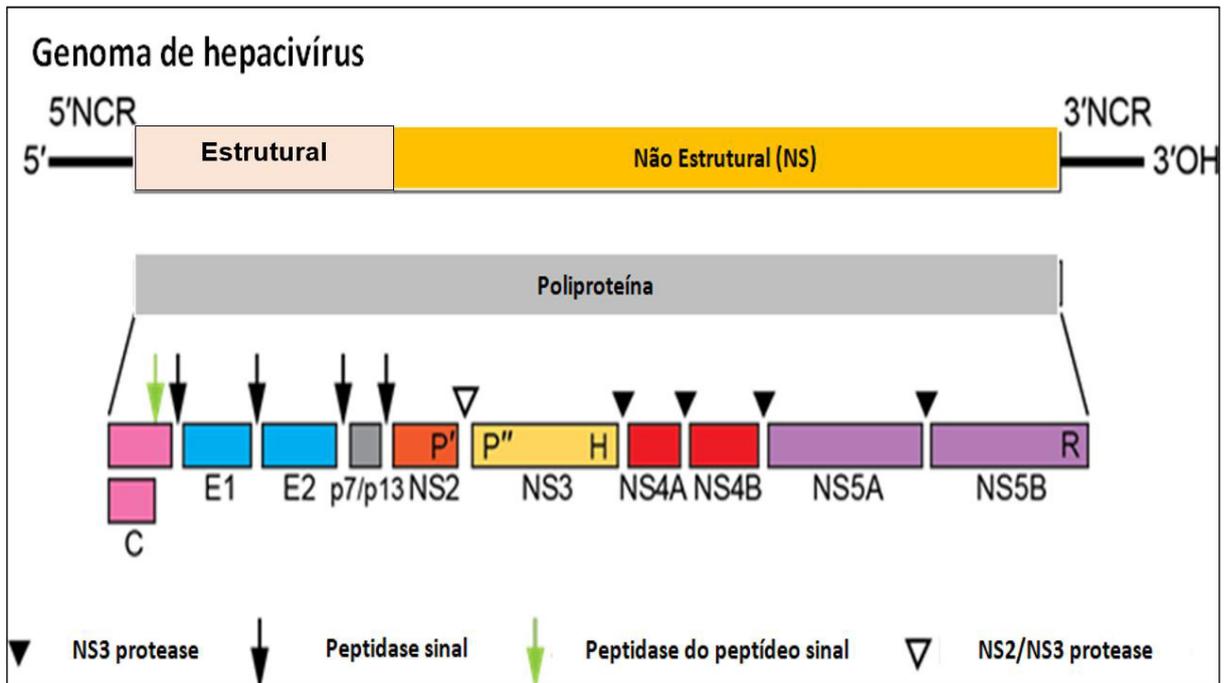


Fonte: <https://alchetron.com/Hepatitis-C-virus>

O genoma do hepacivírus tem uma única estrutura de leitura aberta longa (ORF) composta por locais não codificantes (NCRs) de terminal 5' e 3' que terminam em estruturas secundárias específicas importantes para a replicação e tradução do genoma (**Figura 9**). A ordem do gene é 5'-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-3'. Após a junção das proteínas estruturais (C, E1, E2), há a proteína p7 no HCV, p13 no vírus da hepatite B e outras proteínas em outros hepacivírus, seguidas pelas proteínas não estruturais na porção 3' ORF. Contudo, proteínas virais são produzidas a partir de uma poliproteína que é co- e pós-translacionalmente degradada por proteases celulares e virais. A peptidase sinalase encontrada no retículo endoplasmático (RE) das células hospedeiras é responsável pela hidrólise das ligações peptídicas da poliproteína na junção entre C-prM, prM-E, E-NS1 e NS4A-NS4B, a serina protease viral NS3 é utilizada na hidrólise das ligações peptídicas na

junção entre NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A e NS4B-NS5, e uma protease desconhecida situada no RE atua na hidrólise na junção NS1-NS2A. (LIN *et al.*, 2004; SIMMONDS *et al.*, 2017; PFAENDER *et al.*, 2015).

Figura 9. Genoma do Flaviviridae.



Fonte: SIMMONDS *et al.*, 2017.

1.1.3. Diagnóstico e tratamento do HCV

Em pacientes com suspeita clínica de infecção por HCV, a recomendação para o diagnóstico é que sejam utilizados pelo menos dois testes sorológicos laboratoriais. Iniciando com a pesquisa de anticorpos contra esse vírus, utilizando o ensaio enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), que identifica anticorpos anti-HCV no soro do paciente infectado em uma a duas semanas da infecção viral, na fase aguda da doença. No entanto, a infecção crônica é confirmada com identificação dos anticorpos anti-HCV e HCV-RNA ou replicação viral por mais de seis meses (CHEVALIERES, 2011; CONITEC, 2018; HAJARZADEH *et al.*, 2012).

O segundo teste a ser realizado, é o teste molecular para diagnosticar a replicação viral através da identificação do HCV-RNA na circulação sanguínea do paciente, sendo importante para confirmar o diagnóstico e na escolha da terapia antiviral, por amplificar as regiões específicas do genoma viral. Esse teste molecular pode ser qualitativo, quando identifica a presença ou a ausência do HCV-RNA, por

meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) ou dos testes de transcrição mediada por amplificação (TMA) ou quantitativo, também chamado de carga viral, quando quantifica o número de cópias de genomas virais na circulação sanguínea, através da PCR em tempo real ou ensaio de amplificação de sinal por DNA ramificado (Branched-DNA) (CONITEC, 2018; GUPTA et al., 2014).

O tratamento do HCV está indicado para todos os pacientes diagnosticados, tanto na forma aguda como na crônica, tendo como meta reduzir a progressão da doença hepática e a transmissão viral. Além disso, o tratamento da hepatite C crônica também tem importância na prevenção da mortalidade precoce. O tratamento do HCV sem interferon, na vigência de HCC, é controverso, pois o tumor pode recidivar após o tratamento, sendo recomendado adiar o tratamento para o pós-transplante, naqueles pacientes com possibilidade de serem transplantados em menos de 6 meses. Os pacientes com HCC e tratados com AADs precisam ser seguidos periodicamente para o diagnóstico precoce de eventuais recidivas ou de avanço do tumor. A eliminação do vírus após a finalização da terapêutica é confirmada através do HCV-RNA indetectável na 12^a ou na 24^a semana (AASLD-IDSA HCV, 2018; CONITEC, 2018; EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER, 2018; TERRAULT *et al.*, 2017).

No entanto, nem sempre os pacientes portadores do HCV podem ser tratados no tempo de um ano, sendo importante estabelecer prioridades como em pacientes com fibrose avançada (F3 e F4 de METAVIR), risco de evoluir para doença mais grave, risco de transmissão do HCV e presença de alterações extra-hepáticas da infecção pelo HCV (**Tabela 1**) (EASL, 2015).

Tabela 1. Indicações para o tratamento da hepatite C crônica em 2015.

Prioridade para o tratamento	Grupo de pacientes
Tratamento indicado	<ul style="list-style-type: none"> • Todos os pacientes naïve ao tratamento e com experiência terapêutica com doença hepática compensada e descompensada
Tratamento deve ser prioritário	<ul style="list-style-type: none"> • Doentes com fibrose (F3) ou cirrose (F4) significativas, incluindo cirrose descompensada • Doentes com coinfeção por vírus da imunodeficiência humana. • Doentes com coinfeção por VHB • Doentes com indicação para transplante hepático • Doentes com recidiva de HCV após transplante hepático • Doentes com manifestações extra-hepáticas clinicamente significativas • Doentes com fadiga debilitante • Indivíduos com risco de transmissão do HCV (incluindo consumidores ativos de drogas injetáveis, homens que fazem sexo com homens com práticas sexuais de alto risco, mulheres em idade fértil que desejam engravidar, doentes em hemodiálise e população prisional)
Tratamento justificado	<ul style="list-style-type: none"> • Doentes com fibrose moderada (F2)
Tratamento pode ser diferido	<ul style="list-style-type: none"> • Doentes sem doença ou com doença ligeira (F0-F1) e nenhuma das manifestações extra-hepáticas acima mencionadas
Tratamento não recomendado	<ul style="list-style-type: none"> • Doentes com esperança de vida limitada devido a comorbilidades não hepáticas

Fonte: Adaptado de EASL, 2015.

A terapêutica mais comum até 2011 para o tratamento do HCV foi a combinação do interferon peguilado (PEG-IFN) e ribavirina (RBV), em pacientes portadores do genótipo 1, onde o índice de resposta virológica sustentada (RVS), que é definida como RNA do HCV indetectável em 12 semanas (SVR12) ou 24 semanas (SVR24) após o término do tratamento, variava em torno de 40% a 50% (CONITEC, 2012; SIRQUEIRA, 2017). O tratamento com PEG-IFN/RBV tinha uma melhor resposta nos genótipos virais 2 e 3, com um índice de RVS em torno de 80%. No entanto, alterações laboratoriais e efeitos colaterais como cardiopatia grave, disfunção tireoidiana não controlada, distúrbios psiquiátricos não tratados, neoplasia recente, insuficiência hepática, antecedente de transplante não hepático, distúrbios hematológicos (anemia, leucopenia e plaquetopenia) e doença autoimune foram frequentes com essa terapêutica, sendo necessário monitoramento clínico e laboratorial rigoroso e frequente. Além do que, por causa dos intensos efeitos colaterais, a duração do tratamento em torno de 12 semanas e a incerteza na cura, era comum a interrupção do tratamento por parte dos pacientes (CONITEC, 2012; EASL, 2015)

No Brasil, a partir de 2011, foram implementadas as primeiros fármacos de ação direta (Boceprevir e Telaprevir), classificados como inibidores de protease de 1^a

geração, apresentando melhores respostas e menos efeitos colaterais. O índice da RVS com essa terapia aumentou para em torno de 80% e o tempo de tratamento foi reduzido para 48 semanas. Por outro lado, esses fármacos apresentaram alto custo e importante potencial mutagênico com baixa barreira genética à resistência viral, levando à resistência ao fármaco por alguns subtipos do vírus. No entanto, para o tratamento com esse esquema terapêutico, o paciente precisa preencher todos os critérios como: fibrose hepática avançada (METAVIR F3 ou F4) ou F2 há mais de três anos, monoinfecção pelo genótipo 1 do HCV, ausência de tratamento prévio com inibidores de protease e doença hepática compensada (CONITEC, 2012; EASL, 2015).

A partir de 2015, houve a aprovação pela ANVISA do sofosbuvir, daclatasvir e o simeprevir para o tratamento do HCV, tanto na fase aguda como na crônica. Esse novo tratamento superou os medicamentos utilizados anteriormente, tanto na redução dos efeitos colaterais, do tempo de tratamento, da solicitação de exames de biologia molecular para avaliação, como também apresentou um RVS superior, alcançando 100% de efetividade em alguns subgrupos de pacientes. (EASL, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2017; SIRQUEIRA, 2017)

O tratamento da infecção pelo HCV tem avançado com a liberação de numerosos fármacos de diferentes mecanismos de ação, pois em 2018, o *Food and Drug Administration* (FDA) e a *European Medicines Agency* (EMA) aprovaram 13 AADs incluídos em quatro classes (**Tabela 2**), e vários AADs que combinam doses fixas para a terapêutica de pacientes infectados pelo HCV.

Tabela 2. Antivirais de ação direta (AADs) conforme a classe

Inibidores de NS3/4A (protease)	Inibidores de NS5A	Inibidor da polimerase de NS5B (Análogo de nucleotídeo)	Inibidor da polimerase de NS5B (Análogo não de nucleotídeo)
Glecaprevir	Daclatasvir	Sofosbuvir	Dasabuvir
Voxilaprevir	Velpatasvir		
Grazoprevir	Ledipasvir		
Paritaprevir	Ombitasvir		
Simeprevir	Pibrentasvir		
	Elbasvir		

Fonte: Adaptado do WHO, 2018.

A terapia AADs foi bem aceita no tratamento do HCV por ser mais simples, ter melhor tolerância, apresentar menor duração, menor necessidade de exames de biologia molecular para avaliação do tratamento, e ser mais eficaz quando comparado

com os fármacos anteriormente indicados. Esses fármacos também fornecem a oportunidade de cura em mais de 90% dos casos de pessoas infectadas pelo HCV (AASLD-IDSA HCV, 2018; CONITEC, 2018; EASL, 2018).

A RVS é o melhor método de avaliar o sucesso do tratamento, resultando na redução da possibilidade de progressão para insuficiência hepática, cirrose, HCC e transplante hepático. No entanto, mesmo com RVS, em pacientes classificados com grau de fibrose F3 ou F4 de METAVIR, esses pacientes precisam ser acompanhados periodicamente, pois, podem desenvolver complicações da doença hepática como HCC (VAN DER MEER *et al.*, 2012; EASL, 2015; AASLD-IDSA HCV, 2018).

A organização mundial de saúde (OMS) tem recomendado o uso de AADs pangenotípicos, que é definido como uma taxa de RVS > 85% em todos os seis principais genótipos do HCV, para o tratamento de pessoas infectadas com o HCV de 18 anos de idade ou mais, em adultos sem cirrose (**Quadro 1**) e adultos com cirrose (**Quadro 2**) (AASLD-IDSA HCV, 2018; CONITEC, 2018; EASL, 2018; WHO, 2018).

Quadro 1. AADs pangenotípicos disponíveis para o tratamento de pacientes infectados pelo HCV sem cirrose.

- Sofosbuvir / velpatasvir por 12 semanas
- Sofosbuvir / daclatasvir por 12 semanas
- Glecaprevir / pibrentasvir por 8 semanas (16 semanas para pacientes com infecção pelo genótipo 3 que receberam interferon e / ou ribavirina no passado).

Fonte: Adaptado do WHO, 2018.

Quadro 2. AADs pangenotípicos disponíveis para o tratamento de pacientes infectados pelo HCV com cirrose compensada.

- Sofosbuvir / velpatasvir por 12 semanas
- Glecaprevir / pibrentasvir por 12 semanas (Para pacientes com infecção pelo genótipo 3 que receberam interferon e / ou ribavirina no passado).
- Sofosbuvir / daclatasvir por 24 semanas
- Sofosbuvir / daclatasvir por 12 semanas (Esse tratamento pode ser acrescentado em países onde a distribuição do genótipo é conhecida e a prevalência do genótipo 3 é < 5%).

Fonte: Adaptado do WHO, 2018.

1.2. Cirrose hepática por vírus da hepatite C

A cirrose hepática é caracterizada como o estágio terminal de muitas doenças hepáticas crônicas e definida como um processo difuso caracterizado pelo estágio final da fibrose hepática avançada, progredindo para septos fibrosos em ponte que substituem múltiplos lóbulos adjacentes e nódulos parenquimatosos decorrentes da

regeneração de hepatócitos, finalizando na perda normal da arquitetura do fígado (CRAWFORD, 2000) (**Figura 10**). Essa patologia é causada por diferentes causas como: HCV e vírus da hepatite B crônica (VHB), HCC, doenças metabólicas hereditárias (hemocromatose, doença de Wilson, deficiência de alfa-1-antitripsina), esteatose hepática não alcoólica, hepatite autoimune, hepatite medicamentosa, síndrome de Budd-Chiari, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, trombose da artéria hepática e veia porta, e etc. (PARKIN *et al.*, 2005; MANCUSO *et al.*, 2014).

Figura 10. Características macroscópicas do fígado cirrótico



Explantado do transplante ortotópico de fígado do Hospital Geral de Fortaleza. Arquivo próprio.

A cirrose é uma patologia que em relação ao prognóstico é classificada em dois estágios principais: cirrose compensada e descompensada. A descompensação ocorre na presença de características clínicas descompensadoras como ascite, hemorragia de varizes esofágicas e encefalopatia hepática. A sobrevivência mediana em pacientes compensados supera os 12 anos, já naqueles com quadro clínico descompensado é em torno de 1,8 anos. No entanto, também, há complicações menos importantes como síndrome hepatopulmonar, prurido generalizado intratável e síndrome hepatorenal (GARCIA-TSAO *et al.*, 2017).

A avaliação clínica consiste nos fatores de risco e no exame físico detalhado para identificar estigmas de doença hepática crônica. O diagnóstico é conduzido através da avaliação laboratorial, endoscopia digestiva alta, métodos de imagem (Tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética) e biópsia hepática.

1.2.1. Estadiamento e prognóstico da cirrose hepática

A identificação e o estadiamento da cirrose hepática poderão ser realizados através da utilização da biópsia hepática, da elastografia hepática ou dos escores APRI e FIB4 (CONITEC, 2017).

A biópsia hepática é o exame de eleição para avaliar o estadiamento da cirrose hepática crônica por vírus C, dano tecidual e grau de inflamação. Consiste em um procedimento cirúrgico invasivo e de alto custo para a retirada de fragmentos do tecido hepático, podendo causar dor no local da punção e sangramento (apesar de ser raro), podendo acontecer em 0,8% a 1,7% dos casos. A mortalidade é baixa, variando de 0% a 0,4%. Também não é isento de limitações como erros no local da biópsia, tamanho insuficiente e discrepância na classificação do fragmento. (OLGA *et al.*, 2003; SALUDES *et al.*, 2014).

Há vários modelos para classificar a gradação e o estadiamento das hepatites crônicas. No entanto, nesse estudo, na avaliação histológica da hepatite C, utilizamos a classificação de METAVIR, por ser o método mais indicado em pacientes com hepatite C crônica, proposta pelo *French METAVIR Cooperative Study Group*, que avalia a necroinflamação numa escala de 0 até 3 e a fibrose numa escala de 0 até 4, computando até 7 pontos. A lesão histológica pode ser avaliada utilizando o algoritmo que considera a necrose fragmentada (0 = ausente, 1 = alteração focal da placa periportal em alguns tratos portais, 2 = alteração difusa da placa periportal em alguns tratos portais ou lesões focais em todos os tratos portais, 3 = alteração difusa da placa periportal em todos os tratos portais) e necrose lobular (0 = menor que um foco necroinflamatório por lóbulo, 1 = pelo menos um foco necroinflamatório por lóbulo, 2 = vários focos necroinflamatórios por lóbulo ou necrose confluyente ou em ponte) (**Tabela 3**) (BEDOSSA *et al.*, 1994; BEDOSSA *et al.*, 1996).

Tabela 3. Classificação de METAVIR conforme a atividade histológica e fibrose.

Atividade histológica	Infiltrado inflamatório	Fibrose	Fibrose
A0	Sem atividade	F0	Sem fibrose
A1	Atividade mínima: *Necrose fragmentada– grau: 1 **Necrose lobular–grau: 0 a 1	F1	Fibrose portal sem septos
A2	Atividade moderada: *Necrose fragmentada – grau: 2 **Necrose lobular – grau: 0 a 1	F2	Fibrose portal com poucos septos
A3	Atividade severa: *Necrose fragmentada– grau: 3 **Necrose lobular– grau: 0 a 2	F3	Numerosos septos sem cirrose
		F4	Cirrose

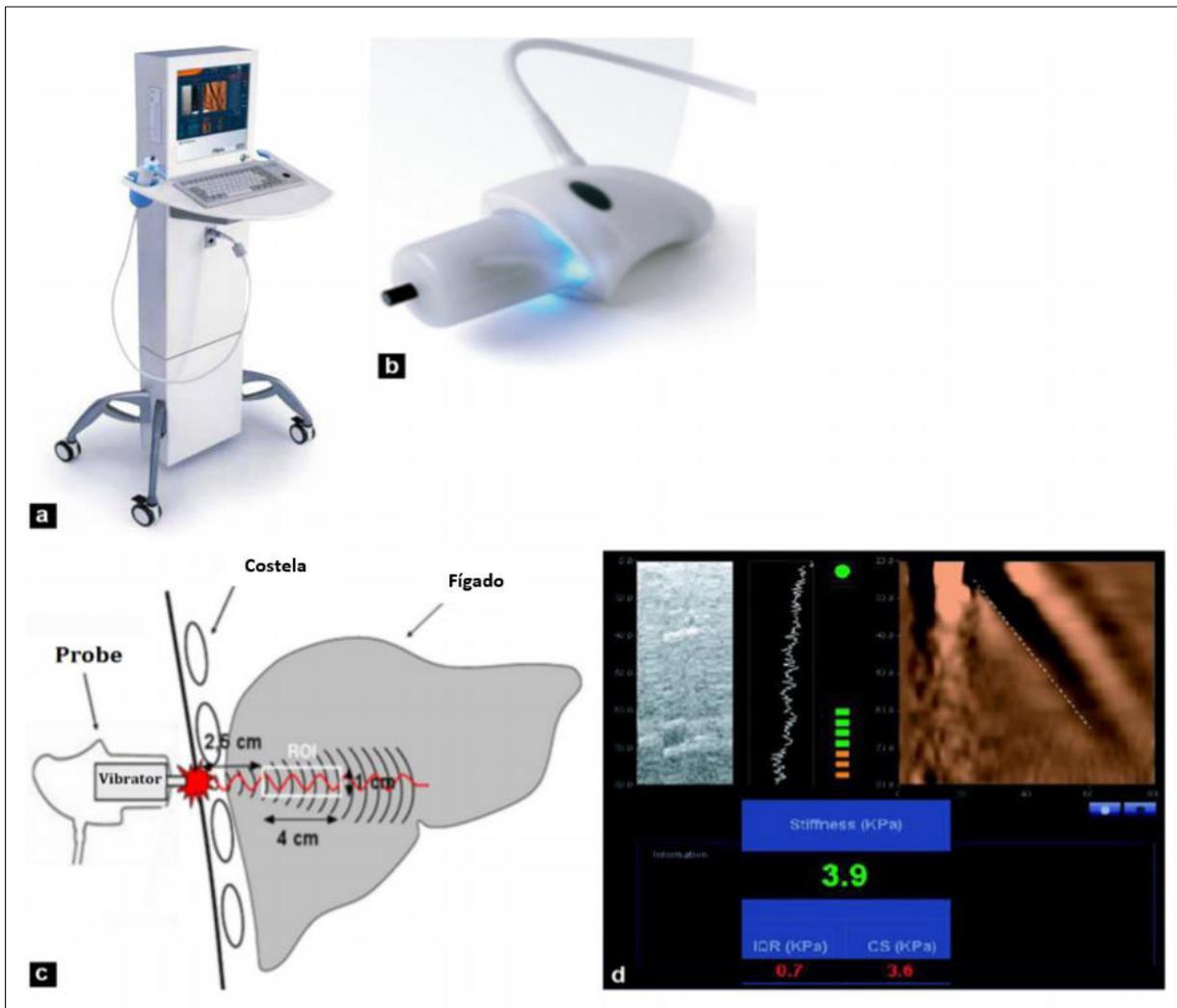
*Necrose fragmentada (0 = ausente, 1 = alteração focal da placa periportal em alguns tratos portais, 2 = alteração difusa da placa periportal em alguns tratos portais ou lesões focais em todos os tratos portais, 3 = alteração difusa da placa periportal em todos os tratos portais).

**Necrose lobular (0 = menor que um foco necroinflamatório por lóbulo, 1 = pelo menos um foco necroinflamatório por lóbulo, 2 = vários focos necroinflamatórios por lóbulo ou necrose confluyente ou em ponte)

Fonte: BEDOSSA *et al.*, 1994; BEDOSSA *et al.*, 1996.

A elastografia hepática é um método diagnóstico da fibrose hepática não invasivo, que mede a velocidade de propagação de ondas ultrassonográficas de baixa frequência quando atravessam o fígado, determinando o grau de fibrose hepática. A velocidade de propagação da onda de ultrassom associa-se diretamente com a elasticidade, ou seja, quanto mais endurecido for o tecido, mais rápida é a propagação das vibrações, veja **Figura 11**. Assim, quanto mais elevado é o resultado em kilo Pascals (kPa), maior é o grau de fibrose do parênquima hepático. Esse exame correlaciona a velocidade de propagação com o escore METAVIR, tendo possibilidade de diagnosticar o estágio de fibrose no fígado. A **Tabela 4** descreve a correlação com as medidas em kPa e m/s (CONITEC, 2015; FRULIO *et al.*, 2013; TSOCHATZIS *et al.*, 2011).

Figura 11. Equipamento Fibroscan e o princípio de funcionamento da elastografia transitória.



Fibroscan®: **(a)** instrumento Fibroscan®; **(b)** sonda Fibroscan®; **(c)** diagrama resumindo o princípio de uma medição; **(d)** exemplo do resultado produzido pelo dispositivo.

Fonte: adaptado de FRULIO *et al.*, 2013.

Esse exame correlaciona a velocidade de propagação com o escore METAVIR, tendo possibilidade de diagnosticar o estágio de fibrose no fígado. A **Tabela 4** descreve a correlação com as medidas em kPa e m/s (CONITEC, 2015; TSOCHATZIS *et al.*, 2011).

Tabela 4. Correlação do score de METAVIR com as medidas em kPa e m/s.

METAVIR	kPa	m/s
F0	2,0-4,5	0,81-1,22
F0-F1	4,5-5,7	1,22-1,37
F2-F3	5,7-12,0	1,37-2,00
F3-F4	12,0-21,0+	2,00-2,64+

Fonte: CONITEC, 2015.

Esse teste tem vantagens como a identificação de uma área superior a área analisada pelo fragmento da biópsia hepática e resultados que informe a real situação do parênquima hepático. No entanto, há limitações como a especificidade da tecnologia, o custo, o treinamento insuficiente do profissional de saúde que realiza o exame, e potenciais interferências em situações que aumentam a rigidez hepática independentemente da fibrose e de atividade necroinflamatória (colestase e ascite). O tratamento da hepatite crônica deve ser considerado em pacientes com elastografia de onda transitória $\geq 9,5$ kPa, pois esse valor de corte se correlaciona com o estágio F3 de fibrose hepática (CONITEC, 2015; TSOCHATZIS *et al.*, 2011).

Na não disponibilização de métodos como a biópsia e a elastografia, os índices de APRI e FIB4 podem ser usados, tendo vantagens em não serem invasivos, têm boa reprodução e baixo custo, de fácil execução, possibilitando a detecção de fibrose avançada, assim como o direcionamento do tratamento utilizando exames laboratoriais simples (BRASIL, 2017; CONITEC, 2018). Esses métodos são validados pela OMS e fornece o diagnóstico dos graus de estágio da fibrose. Quando esses testes são realizados combinados, detém maior sensibilidade e confiabilidade (CONITEC, 2018; WHO, 2014).

O índice da relação de aspartato aminotransferase (AST) sobre plaquetas (APRI) (**Quadro 3**) é um teste simples, que apresenta elevada acurácia, usando resultados laboratoriais de AST e contagem de plaquetas, podendo identificar pacientes com hepatite C crônica, apresentando significado grau de fibrose e cirrose com elevado grau de precisão. Sendo útil para o seguimento dos pacientes durante e após o tratamento do HCV, reduzindo a necessidade de amostras de biópsias hepáticas (YILMAZ *et al.*, 2011; WAI *et al.*, 2003). A interpretação do grau de fibrose está relacionada a valores numéricos: Valores de APRI $\leq 0,5$ apontam para probabilidade de fibrose F0-F1 conforme METAVIR de 72,7%, indicando que as chances de fibrose são reduzidas e valores de APRI $\geq 1,5$, apontam para probabilidade de fibrose F3-F4 conforme METAVIR de 54,2%, indicando a presença de fibrose significativa (WAI *et al.*, 2003).

Quadro 3. Cálculo do índice da relação de aspartato aminotransferase (AST) sobre plaquetas (APRI).

- $APRI = [AST \text{ (U/L)} / 35 \text{ (ULN*)}] / \text{plaquetas} \times 100$
*ULN: O limite superior da AST normal é estimado a 35

Fonte: WAI *et al.*, 2003

O fibrosis-4 (FIB4), que é um índice para fibrose hepática, utiliza valores de cortes F0-F1 (FIB4 < 1,45) e F3-F4 (FIB4 > 3,25). No entanto, uma pontuação de FIB-4 < 1,45 apresentou um valor preditivo negativo de 90% para fibrose avançada (escore de fibrose de Ishak de 4-6 que diagnostica fibrose de ponte precoce para cirrose) (ISHAK *et al.*, 1995). Por outro lado, um FIB-4 > 3,25 apresentou uma especificidade de 97% e um valor preditivo positivo de 65% para fibrose avançada. No estudo clínico em que essa fórmula foi validada pela primeira vez, em torno de 70% dos pacientes apresentaram valores < 1,45 ou > 3,25. Os autores levantaram que esses pacientes poderiam ter evitado a realização da biópsia hepática com uma precisão de 86%. Esse teste é calculado usando a idade e resultados de AST, alanina aminotransferase (ALT) e plaquetas (**Quadro 4**) (STERLING *et al.*, 2006; VALLET-PICHARD *et al.*, 2007).

Quadro 4. Fibrosis-4 (FIB4), índice para fibrose hepática

- $FIB4 = (Idade \times AST) / (\text{Plaquetas} \times \sqrt{ALT})$

Fonte: STERLING *et al.*, 2006 e VALLET-PICHARD *et al.*, 2007.

É recomendado o tratamento para pacientes monoinfectados pelo HCV com APRI > 1,5 ou FIB4 > 3,25, correlacionado com METAVIR ≥ F3 (CONITEC, 2017).

Na **Tabela 5** está descrita a correlação dos resultados de APRI e FIB4 com a escala METAVIR.

Tabela 5. Descrição de fibrose hepática de acordo com valores de APRI e FIB4.

APRI (avaliação de fibrose hepática avançada)			
Resultado	< 0,5	0,5 - 1,49	≥ 1,5
Interpretação	Baixa probabilidade de fibrose hepática F2, F3 ou F4	Não é possível determinar o estágio de fibrose hepática	Alta probabilidade de fibrose hepática F3 ou F4
APRI (avaliação de cirrose hepática)			
Resultado	< 1,0	1,0 - 1,49	≥ 2,0
Interpretação	Baixa probabilidade de cirrose (F4)	Não é possível determinar o estágio de fibrose hepática	Alta probabilidade de cirrose (F4)
FIB4 (avaliação de fibrose hepática avançada ou cirrose)			
Resultado	< 1,45	1,45 - 3,24	≥ 3,25
Interpretação	Baixa probabilidade de fibrose hepática F2, F3 ou F4	Não é possível determinar o estágio de fibrose hepática	Alta probabilidade de fibrose hepática F3 ou F4

Fonte: CONITEC, 2018.

Para o prognóstico, os modelos mais utilizados são o de Child-Pugh e o MELD ou Modelo para Doença Hepática Terminal, do inglês *Model for End-Stage Liver Disease* (SILVA, 2010; FARNSWORTH *et al.*, 2004; CHOLONGITAS *et al.*, 2006).

A cirrose compensada é diferenciada da cirrose descompensada através do escore de Child-Pugh, que é importante na definição do prognóstico e na avaliação do grau de comprometimento da função hepática, baseado no grau de encefalopatia, ascite, bilirrubina sérica, tempo de protrombina (TP) e albumina sérica, conforme descrito na **Tabela 6** (PENG *et al.*, 2016; TSORIS *et al.*, 2020).

Tabela 6. Classificação Modificada Child-Pugh.

Crítérios	1 Ponto	2 Pontos	3 Pontos
Bilirrubina total (mg/dL⁻¹)	< 2	2 a 3	> 3
Albumina sérica(g/dL⁻¹)	> 3,5	2,8 a 3,5	< 2,8
TP (s) / INR	1 a 3 / < 1,7	3 a 6 / 1,7 a 2,3	> 6 / > 2,3
Ascite	Nenhuma	Leve	Moderada/Grave
Encefalopatia hepática	Nenhuma	Grau I-II	Grau III-IV

Fonte: Adaptado de FARNSWORTH *et al.*, 2004.

A classificação de hepatopatia por Child-Pugh tem correlação com a mortalidade pós-operatória. Na classe A, são incluídos os pacientes com 5 a 6 pontos, tendo uma mortalidade pós-operatória estimada de até 10%. Na classe B, entram os pacientes com 7 a 9 pontos, com estimativa de 30% e na classe C, com pontuação de 10 a 15, a mortalidade pode ser bastante elevada chegando a 80%. Um escore de Child-Pugh > 7 (classe B de Child-Pugh) aponta para descompensação hepática, sendo um critério para inclusão do paciente na fila de transplante hepático (FRANCOZ *et al.*, 2008; MANSOUR *et al.*, 1997; TSORIS *et al.*, 2020).

O modelo matemático MELD é um sistema de pontuação que quantifica a urgência de transplante hepático em pacientes maiores de 12 anos. Ele foi inicialmente descrito em 2000 por MALINCHOC *et al.* (2000), para prever sobrevida no período de três meses de pacientes cirróticos submetidos a shunt portossistêmico *intra-hepático* via *transjugular* (TIPS). Posteriormente, foi validado como preditor de sobrevida de pacientes cirróticos, incluindo os cirróticos candidatos a transplante hepático (KAMATH *et al.*, 2001; WIESNER *et al.*, 2001). Em 2002, a Rede Unida para Compartilhamento de Órgãos (UNOS) utilizou, pela primeira vez, a escala MELD como escore para alocação de pacientes na lista de espera para transplante hepático (MARTIN *et al.*, 2007). No Brasil, esse escore começou a ser utilizado com esse propósito a partir de 2006 (BRASIL, 2006). Ele usa em seu cálculo o logaritmo de valores de creatinina, bilirrubina total e *international normalized ratio* (INR) (**Quadro 5**) (BARBOSA *et al.*, 2010; KAMATH *et al.*, 2001; TELEM *et al.*, 2010).

Quadro 5. Cálculo do escore de MELD

$\text{MELD} = 3,78[\text{Ln bilirrubina sérica (mg/dL-1)}] + 11,2[\text{Ln INR}] + 9,57[\text{Ln creatinina sérica (mg/dL}^{-1})] + 6,43$ <p>Ln = Logaritmo natural</p>

Fonte: Adaptado de BARBOSA *et al.*, 2010.

O MELD é usado atualmente por muitos países como critério de gravidade para posicionamento de pacientes na lista de transplante de fígado e sua pontuação varia de 6 a 40. Faz-se necessário o mínimo de 10 pontos para o paciente ser alocado em lista para transplante (BRASIL, 2006) e sua priorização para realização do procedimento é maior quanto maior for o escore de MELD. Os pacientes com MELD de 0 a 11 evoluem com mortalidade pós-operatória de 5-10%, um MELD de 12 a 25 associa-se a mortalidades de 25 a 54% e quando o MELD é maior que 25, a mortalidade chega a 90% (BARBOSA *et al.*, 2010; KAMATH *et al.*, 2001; TELEM *et al.*, 2010; PENG *et al.*, 2016).

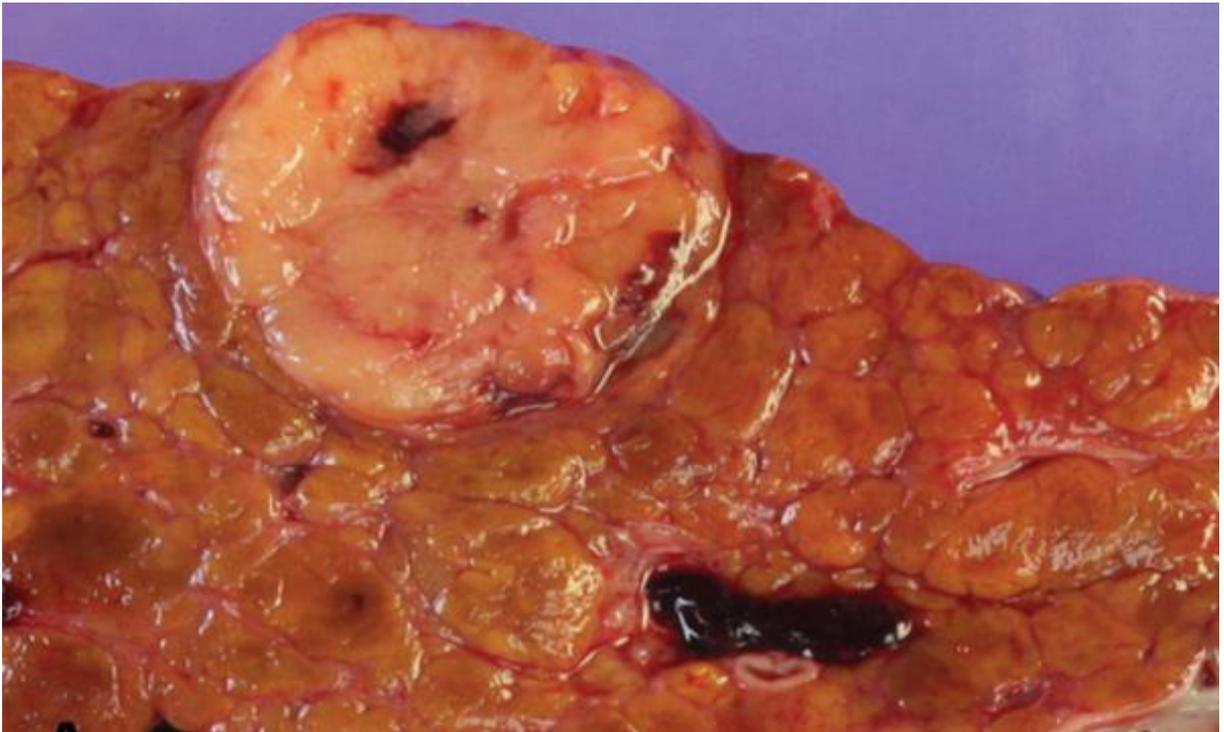
1.3. Carcinoma hepatocelular

1.3.1. Epidemiologia e fatores de riscos

O HCC é o tumor maligno primário mais frequente do fígado e a terceira causa mais prevalente de mortalidade associada ao câncer, sendo um problema de saúde mundialmente considerável (**Figura 12**). A incidência de HCC na população em geral

tende a aumentar com o avanço da idade, tendo maior frequência no sexo masculino e nas regiões menos desenvolvidas. Autores têm levantado que a sobrevida em pacientes diagnosticados com HCC é de menos de 10% em 5 anos (CHAGAS *et al.*, 2019; EL-SERAG *et al.*, 1999; PARKIN *et al.*, 2005; TINKLE E HAAS-KOGAN, 2012).

Figura 12. Aspecto macroscópico do carcinoma hepatocelular avançado



Fonte: PARK *et al.*, 2011.

Há múltiplos fatores de risco para o surgimento do HCC como hepatopatia crônica por vírus (B, C e D), hepatopatias hereditárias metabólicas (hemocromatose hereditária, alfa-1- antitripsina), obesidade, hepatite autoimune, esteato-hepatite não alcoólica. Podendo, também, o HCC ocorrer nas condições sem fatores de risco conhecidos. Dificilmente, o HCC aparece na ausência de cirrose, sendo que todas as causas etiológicas da mesma podem ter complicações pelo desenvolvimento do tumor, apresentando risco maior nos pacientes com hepatite por infecção, principalmente, hepatite por vírus C (DE LOPE *et al.*, 2012; MANCUSO *et al.*, 2014; PARKIN *et al.*, 2005).

1.3.2. Rastreamento e diagnóstico

O rastreamento do HCC é realizado com ultrassonografia de abdome total e alfa-fetoproteína (AFP) a cada 6 meses, em pacientes com fatores de risco. A

identificação precoce aumenta as chances de cura com redução da mortalidade. (CONITEC, 2017; DE LOPE *et al.*, 2012).

A AFP é uma glicoproteína secretada por hepatócitos em regeneração, tanto em doença hepática em atividade como em HCC, e extra-hepáticas, como processos inflamatórios, gestação e outras neoplasias (câncer testicular, colangiocarcinoma e etc.) (GIANNINI *et al.*, 2012; TREVISANI *et al.*, 2001). Seus níveis séricos podem ser alterados pela etiologia e atividade da doença, como também pela agressividade (invasão vascular) e tamanho do tumor (GIANNINI *et al.*, 2012; ZHANG AND YANG, 1999). A AFP foi implementada na prática clínica como marcador tumoral para diagnóstico de HCC em 1970, quando os exames de imagens ainda não estavam completamente disponíveis. Pacientes, geralmente, eram diagnosticados com tumor avançado, com sintomas, e com níveis de AFP em torno de 500 ng/mL, pois apenas níveis superiores a 500 ng/mL podem ser considerados específicos para HCC (uma vez que os valores normais varia de 10 a 20 ng/mL) (MARRERO *et al.*, 2018; WU, 1990).

Autores têm documentado que a análise isolada de AFP tem baixa sensibilidade para o diagnóstico de HCC (EASL-EORTC, 2012; BRUIXAND SHERMAN, 2011). A AFP > 20ng/mL apresentou sensibilidade de 65,9% e especificidade de 90,5% para lesão hepática e a ultrassonografia de abdome apresentou sensibilidade de 43,9% e especificidade de 91,5%. No entanto, na utilização combinada da AFP e da ultrassonografia, a sensibilidade foi para 90,2%, com discreta diminuição da especificidade (83,3%). Assim, os autores sugeriram que o rastreamento seria mais efetivo quando usado combinado, descartando o uso isolado nos níveis de AFP (BRUIX E SHERMAN, 2011; GIANNINI *et al.*, 2012; MARRERO *et al.*, 2018).

O diagnóstico pode ser realizado com ultrassonografia, ultrassonografia com doppler, tomografia computadorizada (TC), ressonância nuclear magnética (RNM) e angiografia. Porém, o diagnóstico definitivo é realizado por meio da TC, que tem sensibilidade de 68% e especificidade de 93%, quando comparado ao exame anatomopatológico, e da RNM, que apresenta sensibilidade de 81% e especificidade de 85% (COLLI *et al.*, 2006)

O diagnóstico com biópsia hepática deve ser reservado para pacientes sem cirrose hepática e nos casos com exames de imagem inconclusivos (CLAVIEN *et al.*, 2012; MARRERO *et al.*, 2018). A American Association for the Study of Liver Diseases recomenda o diagnóstico do HCC, conforme o tamanho do nódulo hepático em pacientes com diagnóstico de hepatite B ou cirrose, de acordo com os critérios de estágio descritos no **Quadro 6**.

Quadro 6. Critérios de estágio de diagnóstico recomendado pela American Association for the Study of Liver Diseases.

- a) Nódulos < 1 cm diagnosticados por ultrassonografia precisam ser acompanhados a cada 3 meses e não havendo crescimento em 2 anos, é considerado como nódulo regenerativo;
- b) Nódulos >1 cm devem ser analisados por 2 exames contrastado - TC ou RM - com objetivo de identificar características típicas, como impregnação marcada nas fases arteriais com lavagem do meio de contraste em fase venosa;
- b1) Caso as características típicas sejam identificadas, não há necessidade de métodos adicionais, pois tem o diagnóstico de CHC;
- b2) Caso não haja as características típicas ao estudo de imagem, pode ser realizado um segundo estudo dinâmico ou mesmo biópsia.

Fonte: MARRERO *et al.*, 2018.

1.3.3. Estadiamento e tratamento

O estadiamento pré-operatório do HCC é importante para definir o tratamento. No entanto, há alguns sistemas de estadiamento como *Cancer of the Liver Italian Program*, *Okuda* e *Barcelona Clinic Liver Cancer*, veja **Quadro 7** e **Figura 13**, que estratificam os pacientes conforme a doença hepática, as características do tumor e o *status* de desempenho, tornando o prognóstico e o tratamento mais apropriados (FORNER *et al.*, 2012; MARRERO *et al.*, 2018). A maioria dos estudos utiliza a classificação de Barcelona por ser amplamente adaptada e divulgada.

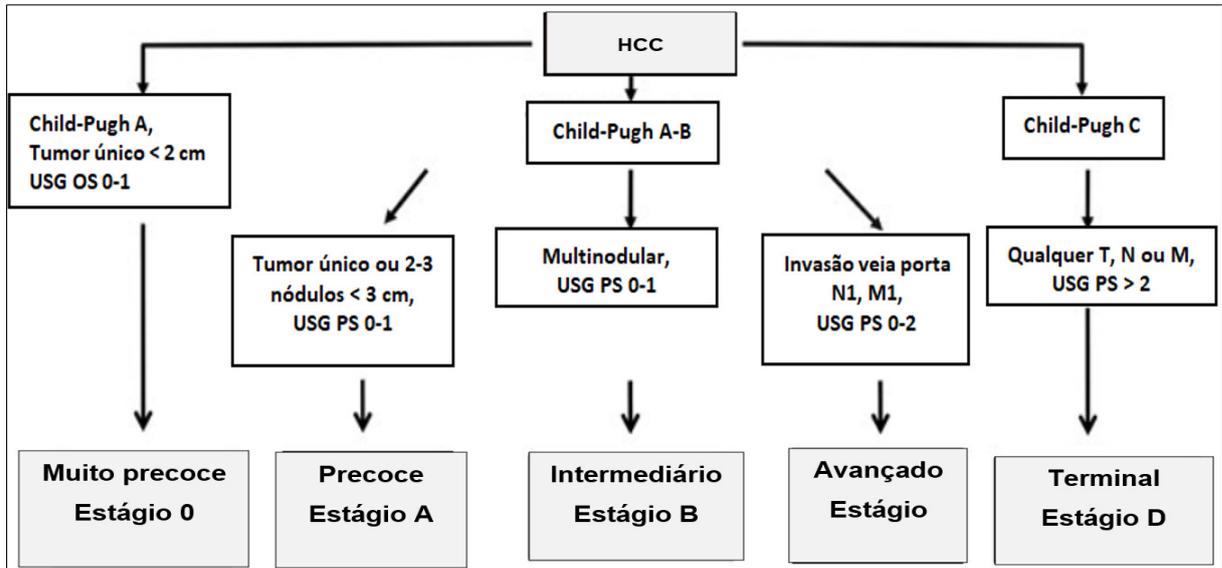
Quadro 7. Estadiamento conforme a classificação de Barcelona Clinic Liver Cancer.

- Estágio 0 ou muito precoce: tumor único < 2 cm, em paciente sem sintoma (PS 0), sem ascite, com bilirrubina total < 3 mg/dL e albumina > 3 g/dL;
- Estágio A ou precoce: tumor único, 5 cm ou até três tumores com até 3 cm de diâmetro, em paciente sem sintomas (PS 0), Child-Pugh A ou B;
- Estágio B ou intermediário: tumor comprometendo mais de 50% do fígado ou multinodular, em paciente sem sintomas (PS 0), Child-Pugh A ou B;
- Estágio C ou avançado: presença de pelo menos um dos seguintes critérios: invasão vascular, disseminação extra-hepática, em paciente sintomático (PS 1 ou 2), Child-Pugh A ou B;
- Estágio D ou terminal: paciente incapacitado (PS 3 ou 4), qualquer que seja a extensão do tumor ou a função hepática (Child-Pugh A, B ou C);

PS, estatus de desempenho.

Fonte: FORNER *et al.*, 2012 e MARRERO *et al.*, 2018.

Figura 13. Sistema de estadiamento da Barcelona Clinic Liver Cancer.



HCC, carcinoma hepatocelular; N, nodal metástase; M, metástase extra-hepática; OS, estatus de desempenho.

Fonte: MARRERO *et al.*, 2018.

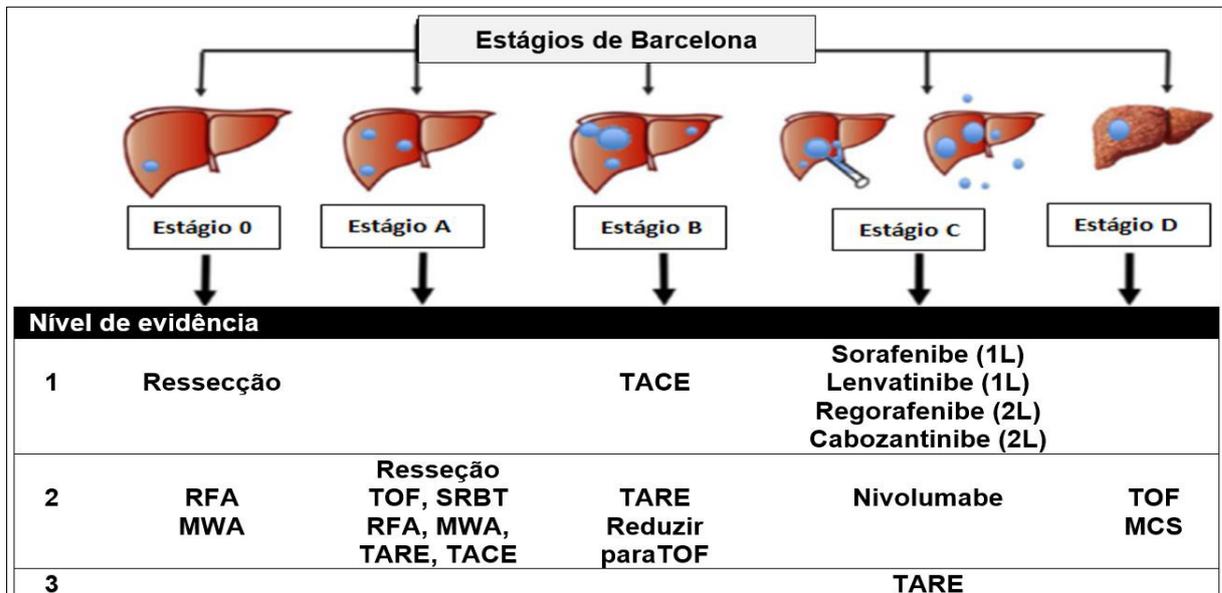
Atualmente, há terapias curativas para o tratamento do HCC como ressecção, ablação e transplante hepático, que podem aumentar a sobrevida desses pacientes em estágio precoce do tumor no estadiamento da *Barcelona Clinic Liver Cancer* e promover a cura em um longo prazo. A quimioembolização tem indicação no tratamento do HCC no estágio intermediário e já no estágio avançado, o tratamento é realizado com sorafenibe, que é um inibidor de multiquinase com efeitos antiangiogênicos e antiproliferativos (**Figura 14**) (CARRILHO *et al.*, 2015; DE LOPE *et al.*, 2012; MARRERO *et al.*, 2018).

O TOF é o método de eleição para tratar o HCC com cirrose hepática, sendo uma técnica adequada em estágios precoces com potencial de cura e aumento da sobrevida (BRUIX E LLOVET, 2009; BRUIX E SHERMAN, 2011; PARKIN *et al.*, 2005). Em um estudo, MAZZAFERRO *et al.* (1996), reportaram sobrevida de 85% em 5 anos com taxa de recorrência menor que 10% em um grupo de pacientes com HCC não ressecável, mas com nódulo único menor que 5 cm de diâmetro ou até três nódulos de até 3 cm de diâmetro, sem invasão macrovascular ou metástases detectáveis, que ficou conhecido como critério de Milão. Pacientes com HCC que estão fora dos critérios de Milão, podem ser submetidos a tratamento como quimioembolização ou embolização arterial, nesses casos, havendo a redução do tumor, eles passam a ser

incluídos nos critérios de Milão (down-staging), sendo posteriormente listados na fila de espera para transplante hepático.

Vários centros transplantadores hepáticos têm discutido e implementado os critérios de Milão expandido, que tem mostrado taxa de sobrevida em 5 anos semelhantes aqueles que foram incluídos nos critérios de Milão, possibilitando o tratamento com TOF de pacientes com a doença em um estágio mais avançado (DUFFY *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2008; YAO *et al.*, 2002). YAO *et al.* (2001) relataram em um estudo, sobrevida em 5 anos de 75% usando critérios de Milão expandido. Tais critérios de Milão expandido são: critérios da Universidade de São Francisco (1 nódulo ≤ 6,5 cm; ≤ 3 nódulos, cada ≤ 4,5 cm com diâmetro total ≤ 8 cm) (YAO *et al.*, 2001), os critérios de Barcelona (1 nódulo ≤ 7 cm, sem satélites; < 3 nódulos ≤ 5 cm ou < 5 nódulos ≤ 3 cm down-staging = OK, ≥ 6 meses) (LLOVET *et al.*, 2004) e o critério até 7 que foi desenvolvido pelo mesmo autor que implementou os critérios de Milão em 1996 (1 nódulo ≤ 7 cm; 2 nódulos ≤ 5 cm ou 3 nódulos ≤ 4 cm ou 4 nódulos ≤ 3 cm ou 5 nódulos ≤ 2 cm) (MAZZAFERRO E SCHIAVO, 2007).

Figura 14. Recomendações de tratamento conforme os estágios da Barcelona Clinic Liver Cancer.



Abreviações: TACE, quimioembolização transarterial; 1L, terapia de primeira linha; 2L, terapia de segunda linha; RFA, ablação percutânea por radiofrequência; MWA, ablação por micro-ondas; TOF, transplante ortotópico de fígado; SBRT, radioterapia estereotáxica corporal; TARE, radioembolização; MCS, melhor cuidado de suporte.
 Fonte: MARRERO *et al.*, 2018.

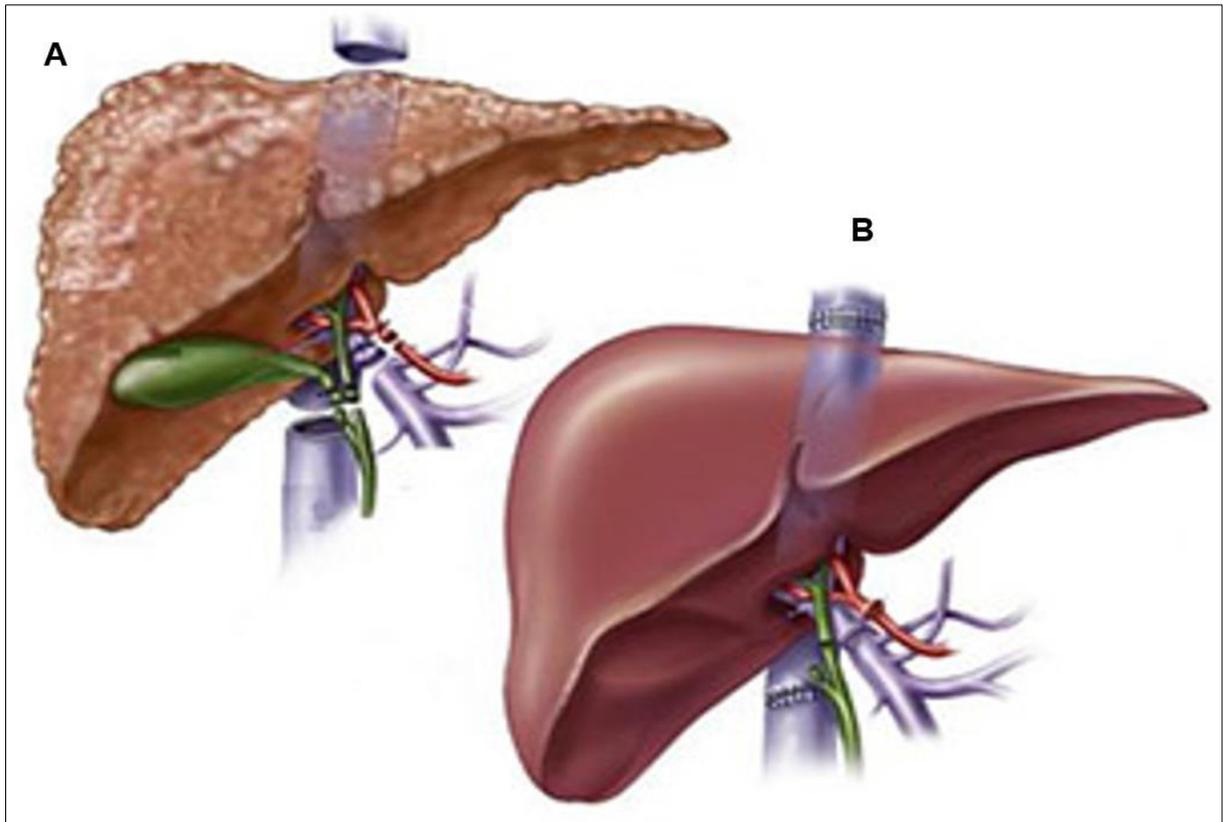
O critério de MELD para seguimento de gravidade na fila de espera de transplante hepático não beneficia algumas doenças graves hepática como ascite refratária, encefalopatia crônica, colangite recorrente, prurido refratário e HCC (COELHO *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2016). No entanto, especificamente para o HCC, foram implementadas as situações especiais ao cálculo do MELD como a inclusão na fila de transplante (20 pontos), após 3 meses (24 pontos), após 6 meses (29 pontos) e o desempate é através do MELD “puro”, que desconsidera a pontuação adicional prevista em lei acrescentada conforme o diagnóstico do paciente (MELD corrigido). Essa pontuação extra de pacientes portadores de HCC, para a alocação na fila de espera de TOF, é importante, pois a neoplasia pode levar à morte por disseminação tumoral (BRASIL, 2006; FREITAS *et al.*, 2016).

Em um estudo de um centro de transplantes do Ceará, os autores perceberam um benefício para os pacientes com HCC, após a implementação do escore MELD no Brasil, com sobrevivência superior do que na era pré-MELD (COSTA *et al.*, 2014).

1.4. Transplante ortotópico de fígado

O TOF é o tratamento de eleição para pacientes portadores de doenças agudas ou crônicas em que os tratamentos conservadores não foram efetivos (**Figura 15**). Em março de 1963 foi realizado o primeiro TOF em humanos pela equipe de Thomas Starzl. As várias anastomoses foram realizadas de forma semelhante às dos experimentos em cão. Porém, nas condições técnico-científicas existentes na época, a cirurgia foi considerada como tendo execução extremamente difícil, com risco transoperatório tão elevado que não permitiria a aplicação clínica imediata, já que os primeiros pacientes transplantados foram a óbito durante o intraoperatório ou no pós-operatório, decorrente de distúrbio de coagulação com complicações hemorrágicas e infecção. Ao mesmo tempo, ficou evidente que as condições disponíveis, tanto para a preservação do enxerto durante o período de isquemia quanto para o controle da rejeição eram inadequadas e insuficientes (STARZL *et al.*, 1963; SONG *et al.*, 2014).

Figura 15. Imagem de ressecção do fígado cirrótico e do fígado transplantado.



(A) ressecção do fígado cirrótico; (B) fígado transplantado.

<https://www.vascularitajuba.com.br/cirurgia-endovascular/intervencao-no-transplante-hepatico>

O advento da ciclosporina A, um potente agente imunossupressor, e sua aprovação pelo FDA em novembro de 1983, revolucionou o controle da rejeição e permitiu que, a partir daquele ano, o transplante de fígado deixasse de ser uma modalidade experimental para ser uma alternativa terapêutica para os pacientes portadores de doença hepática terminal (STARZL *et al.*, 1988).

O primeiro TOF bem-sucedido na América Latina foi realizado no Hospital das Clínicas de São Paulo, pela equipe da unidade de fígado do Dr. Silvano Raia, em 1985. Tratava-se de uma paciente portadora de um tumor primário de fígado que teve uma evolução pós-operatória satisfatória, mas faleceu 13 meses depois em decorrência de recidiva da doença original. Essa mesmo grupo realizou o primeiro TOF intervivos do mundo, em 1988 (RAIA *et al.*, 1989). No Ceará, na madrugada do dia 18 de maio de 2002, foi realizado o primeiro TOF com sucesso pela equipe do Dr. José Huygens Parente Garcia no Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (HUWC-UFC) (GARCIA *et al.*, 2002). No dia 11 de dezembro de 2009 foi realizado o primeiro TOF também com sucesso no Hospital

Geral de Fortaleza (HGF) pela equipe chefiada pela Dra. Ivelise Regina Canítio Brasil, tratava-se de um paciente masculino, de 61 anos, que foi listado no dia anterior ao procedimento com diagnóstico de hepatite fulminante, o transplante durou cerca de 4 horas e esse paciente permanece vivo até os dias atuais.

No Brasil, segundo dados do Registro Brasileiro de Transplantes (2019), durante o ano de 2019, em 14 estados, foram registrados 72 centros transplantadores atuantes com a realização de 2.245 TOF, sendo 229 realizados no estado do Ceará em 2 centros transplantadores, o qual permaneceu em quarto lugar atrás de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná. Nesse mesmo período, no Ceará, o número de pacientes ativos em lista de espera foram 148 com 42 evoluindo para o óbito antes da realização do TOF (RBT, 2019).

A indicação do TOF está relacionada a numerosas causas de falência hepática aguda e crônica como: doença hepática aguda medicamentosa, hepatite autoimune, doenças colestáticas crônicas (cirrose biliar primária e colangite esclerosante), hepatites virais crônicas, doenças metabólicas hereditárias (hemocromatose, doença de Wilson, deficiência de alfa-1-antitripsina), esteatose hepática não alcoólica, síndrome de Budd-Chiari primária, trombose de artéria hepática e veia porta, HCC e etc (PARKIN *et al.*, 2005; MANCUSO *et al.*, 2014).

O TOF pode ser realizado por algumas técnicas cirúrgicas como a convencional (com ou sem circulação extracorpórea) ou a de *Piggyback*. A primeira técnica, convencional com circulação extracorpórea, envolve a ressecção e completa substituição da veia cava retro hepática. Durante a fase anepática, há diminuição importante do retorno venoso, causando alterações metabólicas, instabilidade hemodinâmica e redução global do fluxo renal. A segurança da cirurgia avançou com a utilização de um desvio veno-venoso, que permite a descompressão da veia cava obstruída e do sistema venoso esplâncnico por meio da utilização de um circuito que drena o sangue proveniente da veia cava inferior e veia porta para a veia cava superior, por uma cânula introduzida geralmente na veia axilar esquerda, isto oferece várias vantagens na medida em que evita distúrbios cardiovasculares graves, principalmente hipotensão, que às vezes está associada ao clampeamento da veia cava antes da hepatectomia. Na anastomose da veia cava infra-hepática e portal, o sangue rico em potássio e hidrogênio é devolvido à circulação sistêmica dos leitos

capilares, anteriormente estagnados na parte inferior do corpo e circulação esplâncnica (DENMARK *et al.*, 1983; GRIFFITH *et al.*, 1985; OHKOHCHI *et al.*, 1987; HALL *et al.*, 2013).

A segunda técnica, também convencional, difere da primeira por não utilizar a circulação extracorpórea, e na ressecção da veia cava juntamente com o fígado, alguns pacientes podem não suportar o clampeamento da veia cava supra-hepática e apresentar hipotensão importante. Por outro lado, os pacientes que suportam o clampeamento da veia cava, normalmente necessitam de aporte maior de reposição volêmica, que pode levar a efeitos adversos após a revascularização do enxerto, como sobrecarga cardíaca e congestão do fígado (HALL *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2014).

A terceira técnica chamada de *Piggyback*, evita a interrupção do fluxo da veia cava inferior e a enxertia é realizada como em técnicas convencionais, exceto para a reconstrução de saída, que é realizada entre o enxerto supra-hepático e a superfície anterior da veia cava (um orifício formado usando as grandes veias hepáticas). Esta técnica é, atualmente, a mais amplamente utilizada e uma das principais preocupações sobre este modelo é o risco de obstrução do fluxo venoso relacionado com o pequeno calibre da anastomose ou dobras da veia supra-hepática, a grande vantagem é não necessitar de circulação extracorpórea, evitando complicações relacionadas à mesma como embolia gasosa, tromboembolismo pulmonar, hemólise e coagulopatias (HALL *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2014).

1.5. Apolipoproteína E

A apolipoproteína E humana (ApoE) consiste em uma glicoproteína de 34 kDa, contendo 299 resíduos de aminoácidos, que é um importante componente proteico de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e um ligante para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL-R). (ZANNIS *et al.*, 1982; MAHLEY *et al.*, 1999; MAHLEY E RALL, 2000).

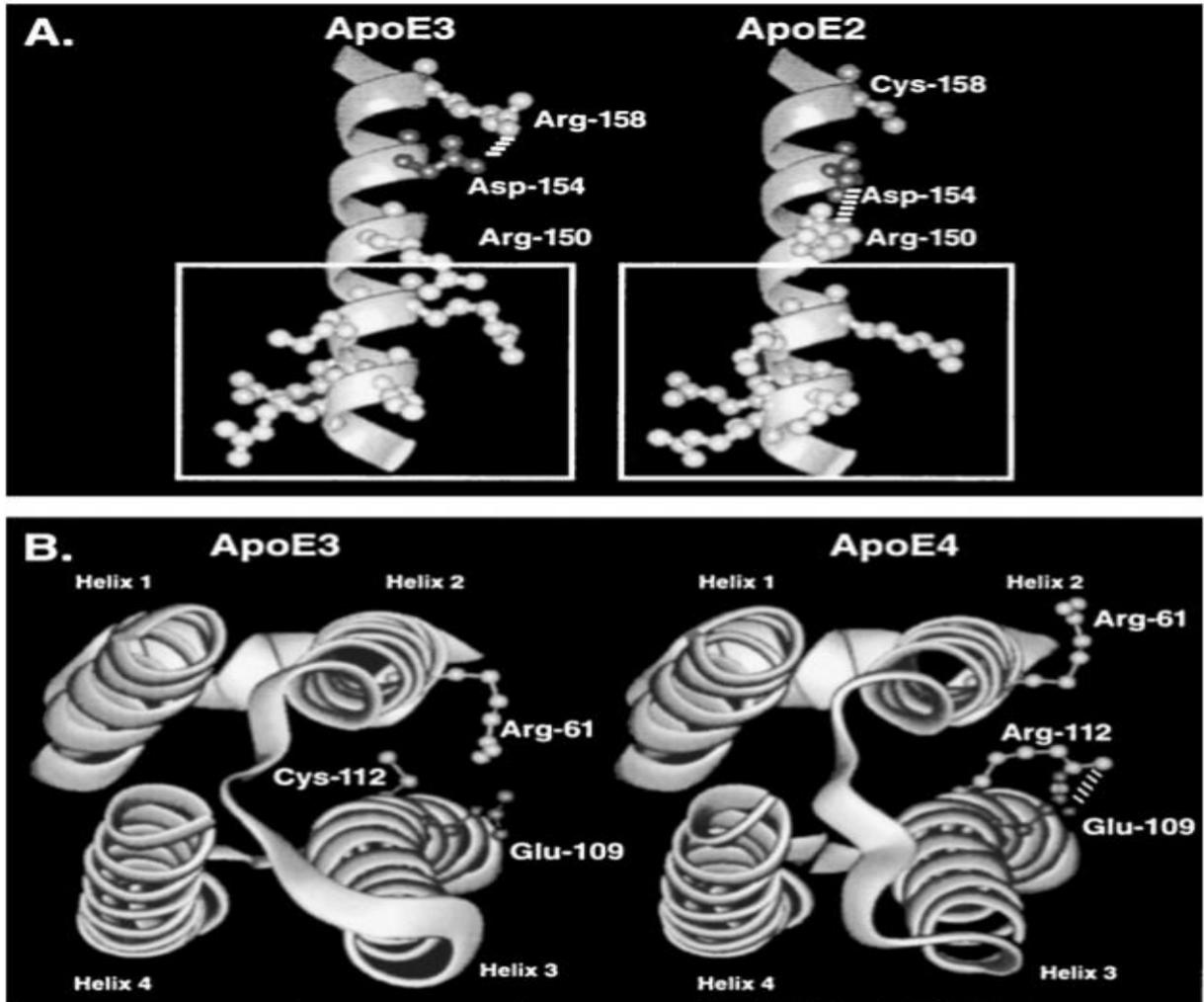
A ApoE é sintetizada principalmente no fígado, mas também no baço, cérebro, rim, pulmões, glândula adrenal, macrófagos-monócitos, tecidos musculares, sistema nervoso central e periférico. Possui ações importantes no reparo neuronal, na regulação da homeostase lipídica e no transporte e metabolismo de triglicérides e colesterol. Também possui funções anti-inflamatórias, convertendo o fenótipo

macrofágico pró-inflamatório M1 em M2 anti-inflamatório e diminuindo a síntese de interleucina-2 (IL-2), bem como em atividades imunomoduladoras, como a ativação e proliferação de linfócitos T. (DRISCOLL E GETZ, 1984; KRAFT *et al.*, 1989; MAHLEY E RALL, 2000; TUDORACHE *et al.*, 2017).

Alguns estudos documentaram a associação entre as isoformas da ApoE e doenças como doença de Alzheimer, aterosclerose, doença hepática causada pelo HCV, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), demência associada ao HIV, tuberculose pulmonar, diarreia infantil e infecção pelo vírus herpes simplex (MAHLEY E RALL, 2000; ORIA *et al.*, 2007; SCHMITZ *et al.*, 2007).

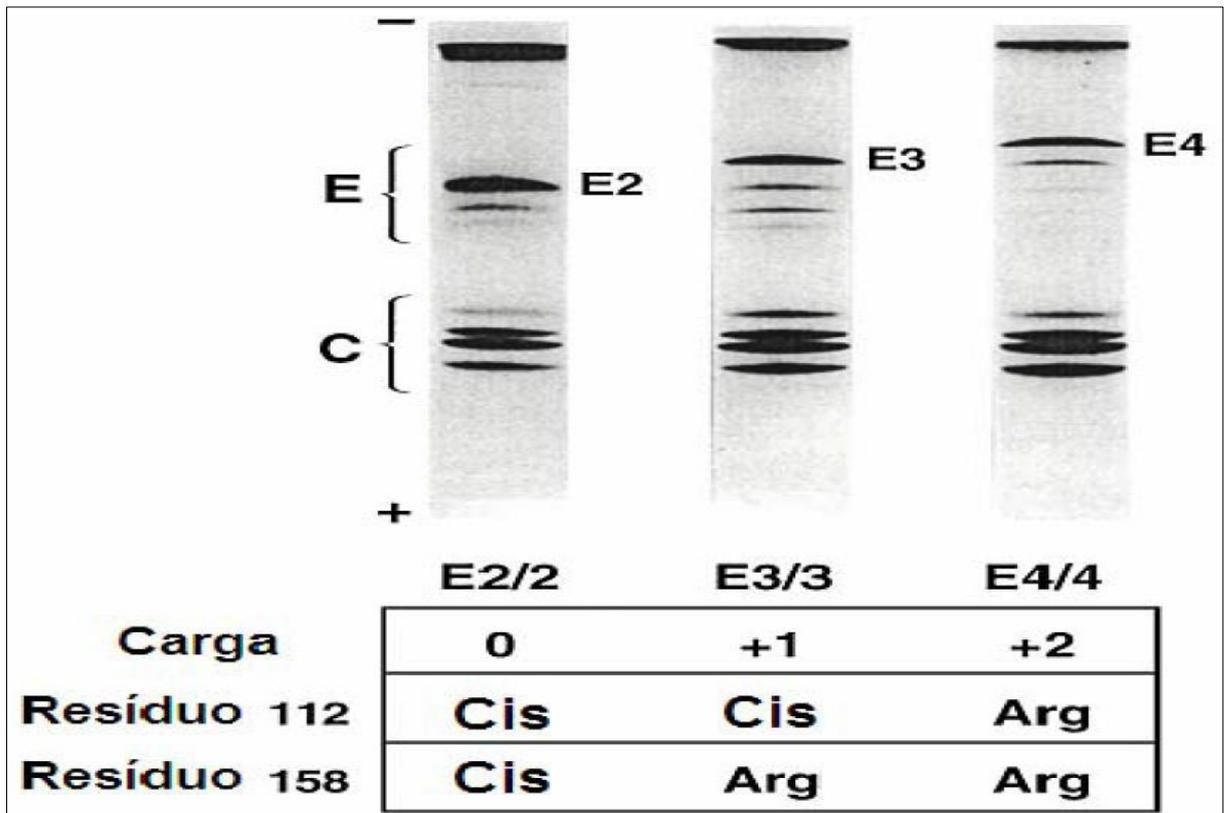
O gene da APOE humana é polimórfico. Em humanos, este polimorfismo é responsável por diferentes isoformas de ApoE, por causa da substituição de uma única base nitrogenada (timina por citosina) em duas posições relevantes da região que codifica a APOE nas posições 112 e 158 (LINTON *et al.*, 1991; 1980; ZANNIS *et al.*, 1982). Existem três alelos comuns do gene APOE, localizados no cromossomo 19 (19q13); estes são chamados E2, E3 e E4, com seis possíveis genótipos: E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4 e E4/E4. O alelo E3 é a isoforma mais frequente, representando 70-80% dos alelos na maioria da população, codificando a isoforma ApoE3 com um resíduo de cisteína na posição 112 e um resíduo de arginina na posição 158. O alelo E4 codifica a isoforma ApoE4, com um resíduo de arginina nas duas posições 112 e 158, enquanto o alelo E2 codifica a isoforma ApoE2, com um resíduo de arginina nas duas posições do cromossomo (E2 = cis-112, cis-158; E3 = cis-112, arg-158; E4 = arg-112, arg-158) (**Figuras 16 e 17**). A frequência do alelo E4 é de 10-15%, já a do alelo E2 é de 5-10%, sendo o mais raro na maioria da população (HUEBBE e RIMBACH, 2017; KRAFT *et al.*, 1989; MAHLEY E RALL, 2000; ZANNIS *et al.*, 1982).

Figura 16. Estrutura tridimensional de regiões de ApoE destacando diferenças de isoformas.



(A) região da hélice 4 em que um rearranjo crítico da ponte salina na ApoE2 reduz o potencial de íons positivos do local de ligação ao receptor de LDL (em caixa). O ácido aspártico 154 altera sua interação iônica na arginina150 na ApoE2 por causa da substituição da cisteína158, puxando a cadeia da arginina150 da nuvem de positividade, reduzindo seu potencial e causando uma redução de 100 vezes na ligação ao receptor de ApoE. (B) o feixe de quatro hélices da ApoE mostrando o rearranjo crítico da cadeia lateral da arginina 61. A substituição da arginina 112 na ApoE4 leva a uma interação iônica com o ácido glutâmico 109 que exclui a cadeia lateral da arginina 61 de sua posição habitual, fazendo com que a arginina 61 fique mais exposta ao lado da hélice 2 e permitindo que ela fique disponível para interação com ácido glutâmico 255 no domínio carboxil-terminal da apoE (não mostrado aqui).
Fonte: adaptado de MAHLEY E RALL, 2000.

Figura 17. Separação isoeletrica de VLDL delipidada que mostra os três fenótipos de ApoE E2, E3 e E4.



As isoformas de apoE2, E3 e E4 diferem sequencialmente por uma unidade de carga como resultado das substituições de aminoácidos mostradas no quadro. As isoformas menores abaixo de cada isoforma principal de ApoE são as isoformas sialiladas. O cátodo (-) e o ânodo (+) são indicados, bem como as posições das isoformas ApoC do VLDL.

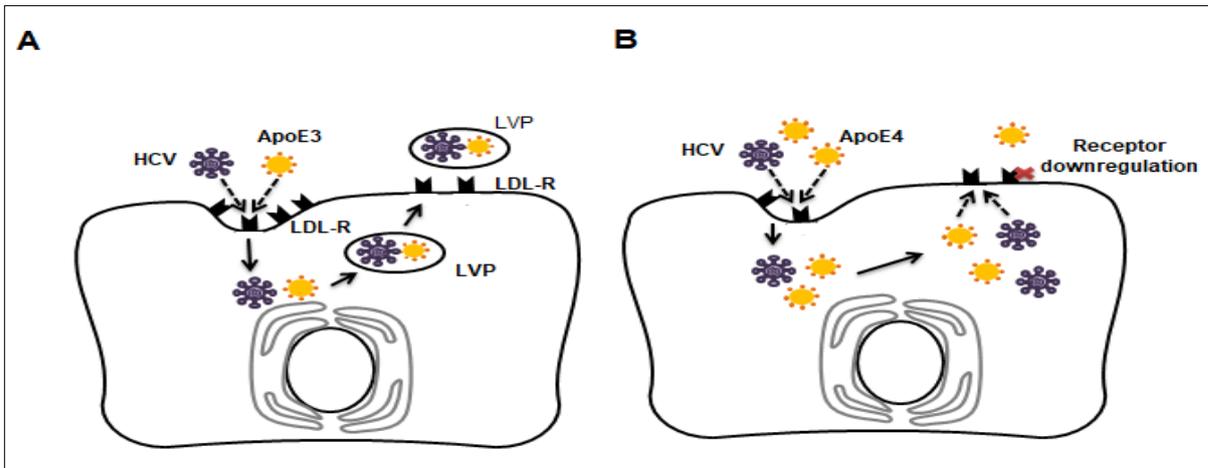
Fonte: adaptado de MAHLEY E RALL, 2000.

As diferenças nos aminoácidos das três isoformas ApoE resulta em diferentes afinidades de ligação aos receptores específicos. Logo a ApoE3 assim como a ApoE4 pode se ligar com alta afinidade ao receptor LDL colesterol, enquanto a ApoE2 tem uma ligação menos efetiva (ZHANG et al., 2007). A ApoE2 tem menos de 99% de capacidade de ligação ao receptor quando comparada a isoforma ApoE3 (MALAVAZI et al., 2004), contudo a isoforma ApoE2 apresentou íntima associação com hipertrigliceridemia e hipocolesterolemia (EICHNER et al., 2002), sendo importante enfatizar que 15% dos E2/E2 homozigotos podem desenvolver disbetalipoproteinemia familiar (também conhecida como hiperlipoproteinemia do tipo III), que leva à hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia e pode estar associada à obesidade e à resistência à insulina (KOOPAL et al., 2017; SCHNEIDER et al., 1981).

1.5.1 Apolipoproteína E, e HCV, TOF e HCC

Estudos têm sugerido que a APOE4 atua como um fator protetor contra a infecção pelo HCV (WOZNIAK *et al.*, 2016; WELLER *et al.*, 2017). No entanto, a entrada do HCV nos hepatócitos humanos é um mecanismo de várias etapas no qual vários fatores do hospedeiro estão envolvidos, incluindo o LDL-R e proteoglicanas de heparansulfato (HSPGs). A partícula lipoviral (LVP), que é importante para a infectividade viral, inicialmente se liga ao LDL-R e HSPGs através da ApoE (ANDRÉ *et al.*, 2002; FELMLEE DJ *et al.*, 2013; POPESCU *et al.*, 2009). Também, foi reconhecido que o LDL-R é regulado negativamente em portadores de ApoE4. Em pacientes ApoE4, a entrada do vírus nos hepatócitos pode ser reduzida (TUDORACHE *et al.*, 2017). A **Figura 18** ilustra o potencial mecanismo protetor da APOE4 contra o HCV nos hepatócitos.

Figura 18. Comparação dos efeitos da ApoE3 e ApoE4 na infecção pelo HCV nos hepatócitos.



(A) Ciclo normal de entrada do vírus da hepatite C (HCV) em hepatócitos via receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL-R). O HCV compete com as partículas da Apolipoproteína E (ApoE) (ApoE3, nesse caso) pela ligação do LDL-R, terminando na formação da partícula lipoviral (LVP), que é importante para a infectividade do vírus. (B) ApoE4 propôs proteção contra a entrada de HCV. Além da ApoE e competição de vírus pela entrada celular via LDL-R, os portadores de ApoE4 mostraram regulação negativa dos receptores de LDL nos hepatócitos e menos capsulamento viral.

Fonte: Adaptado de NASCIMENTO *et al.*, 2020.

A ApoE seria o único fator específico para a produção de partículas infecciosas de HCV; portanto, a ApoE pode influenciar no estágio tardio da infectividade viral após o envoltório do capsídeo viral, sendo essencial para a transmissão viral célula a célula (HUEGING *et al.*, 2014). Uma das hipóteses é que ApoE4 afeta indiretamente a expressão do receptor LDL aumentando a ligação e a internalização das lipoproteínas

(MUELLER *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2016). A outra hipótese, é que a hiperbetalipoproteinemia induzida pela APOE4 poderia interferir diretamente na captação do vírus mediado pelo LDL-R, devido à competição forçada entre betalipoproteínas livres e partículas de lipoproteínas do vírus para receptores locais de LDL (MONAZAHIAN M *et al.*, 1999). Assim, as propriedades funcionais relacionadas à APOE4 no metabolismo lipídico e na regulação negativa de receptores de LDL hepática, podem fornecer uma explicação (corroborando com evidência epidemiológica) de como os portadores da APOE4 são protegidos contra a infecção pelo HCV.

O TOF é o tratamento de eleição para doença hepática terminal (STARZL *et al.*, 1989) e pode também contribuir para a investigação da síntese e degradação de proteínas plasmáticas geneticamente polimórficas. Assim, como a ApoE é uma proteína polimórfica em humanos, alguns estudos já relatam que é possível detectar e quantificar alterações nessas proteínas em pacientes submetidos a transplante de fígado. (KRAFT *et al.*, 1989; LINTON *et al.*, 1991).

LINTON *et al.* (1991) realizaram um estudo amostral de 29 pacientes e relataram que o fenótipo ApoE do soro pós-operatório do receptor foi convertido para o doador. Isto indica que > 90% da ApoE no plasma é sintetizada no sistema hepático. Por outro lado, não houve alteração no fenótipo ApoE do líquido cefalorraquidiano (LCR) do doador para o fenótipo do receptor após o transplante hepático, indicando que a maior parte do ApoE no LCR é sintetizado localmente e não derivado do plasma. KRAFT *et al.* (1989) também enfatizaram que mais de 90% da ApoE em humanos é de origem hepática, uma vez que o novo fenótipo da ApoE após transplante de fígado correspondia ao do órgão doador.

Alguns estudos também demonstraram que a APOE possui ação antioxidante e está aumentada em tumores malignos como gástrico, próstata, ovariano e HCC, principalmente devido ao estresse oxidativo gerado pelas células tumorais (OUE N *et al.*, 2004; CHEN YC *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2003). YOKOYAMA *et al.* (2006) descobriram que os níveis de ApoE em tecidos tumorais eram significativamente maiores do que em tecidos normais não tumorais em 88% dos pacientes, sem qualquer aumento no plasma, e que a ApoE pode ser um marcador bioquímico para o HCC. Eles também mostraram que 72,7% dos pacientes com HCC eram E3/E3.

AHN *et al.* (2012) verificaram que o nível plasmático da ApoE era significativamente maior no grupo de pacientes com cirrose hepática e no grupo com HCC. Eles também observaram que o alelo E3 e o genótipo E3/E3 foram os mais frequentes em ambos os grupos e que o grupo portador do alelo E4 foi o que apresentou menor probabilidade de desenvolver cirrose hepática.

1.5.2. Papel da Apolipoproteína E na fibrose do fígado

A inflamação crônica hepática e a esteatose hepática podem aumentar as taxas de apoptose de hepatócitos e aumentar significativamente a expressão do fator de crescimento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) e do fator de crescimento transformador β (TGF β) que levam à ativação de células Ito e pró-fibrogênese, e genes ativados (MEKALA *et al.*, 2018). Células estreladas hepáticas (células Ito), que representam células armazenadoras de vitamina A no fígado em estado fisiológico, são ativadas durante a inflamação crônica do fígado. Essas células são trans diferenciadas a miofibroblastos que produzem colágenos de matriz extracelular e várias sinais inflamatórios que levam à fibrose hepática e à perda de armazenamento de vitamina A (TSUCHIDA *et al.*, 2017). Células Ito são capazes de sintetizar e liberar peptídeos ApoE (RAMADORI *et al.*, 1989).

Em um estudo de STACHOWSKA *et al.* (2013) avaliando doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), o alelo E4 foi significativamente associado ao desenvolvimento de fibrose avançada, para o metabolismo hepático do ácido graxo e aumento da produção de ácido 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoico (YANG *et al.*, 2005).

A ApoE pode facilitar o efluxo de colesterol de macrófagos periféricos e outras células para formar lipoproteína de alta densidade (HDL). após interação com transportadores ABC. As partículas de HDL liberam o colesterol para os hepatócitos por meio da interação com os receptores de eliminação B1 (SR-BI) ou LDL e posterior conversão em ácidos biliares contendo colesterol, contribuindo para o transporte reverso de colesterol da periferia para hepatócitos e para excreção fecal (GETZ *et al.*, 2018).

Os hepatócitos podem ser esteatóticos por dietas prolongadas com alto teor de gordura, indicando que os hepatócitos podem estar sobrecarregados pelo excesso de

colesterol. O aumento da lipólise com diminuição da oxidação dos triglicerídeos ou aumento da lipogênese, e a redução da secreção de VLDL pelos hepatócitos também estão envolvidos nesse processo. (KOYAMA *et al.*, 2017) Por outro lado, a ApoE tem sido reconhecida como um importante fator contribuinte para melhorar a esteatose hepática. Foi demonstrado que camundongos deficientes em APOE, cronicamente alimentados com dietas ocidentais, desenvolvem esteato-hepatite não alcoólica e fibrose hepática. (SCHIERWAGEN *et al.*, 2015).

1.6. Justificativa

Apesar de alguns estudos evidenciarem a influência da ApoE em hepatopatias, ainda há escassez de pesquisas que investiguem se o alelo da APOE4 é associado a uma doença hepática menos grave relacionada ao HCV no pré- e pós-TOF em comparação com outros alelos da APOE, além também da efetividade do tratamento com fármacos antivirais. Assim, como a ApoE é um marcador na monitorização dessa população específica é de fundamental importância conhecer melhor a sua ação e relevância clínica.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a relação dos três alelos principais (E2, E3 e E4) do gene da apolipoproteína E na cirrose hepática crônica por vírus C associado ou não a carcinoma hepatocelular no perioperatório de TOF.

2.2. Específicos

- Analisar a influência dos alelos (E2, E3 e E4) da APOE na cirrose hepática crônica por vírus C no perioperatório de TOF, conforme:
 1. As classificações de MELD e Child-Pugh.
 2. O estadiamento do grau de inflamação de biópsias de explante hepático categorizados pela classificação de METAVIR.
 3. O estadiamento do grau de fibrose de biópsias do enxerto hepático e escores de APRI e FIB4 no pós-TOF, categorizados pela classificação de METAVIR.
- Analisar a influência dos alelos (E2, E3 e E4) da APOE em carcinomas hepatocelulares no pré-operatório de TOF, conforme:
 1. Os tumores incluídos ou fora dos critérios de Milão.
 2. O estadiamento através da alfa-fetoproteína.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento e população do estudo

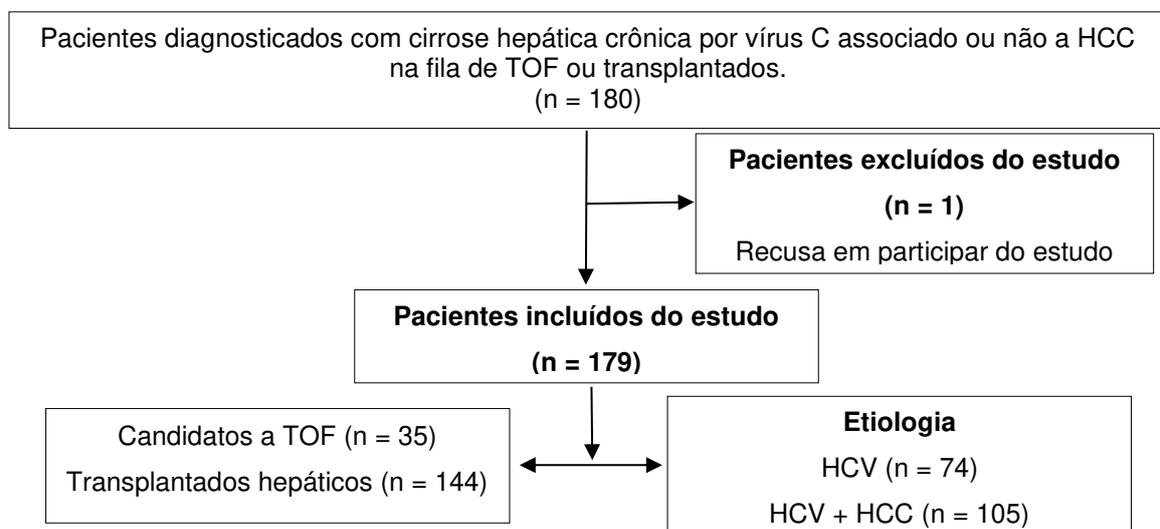
Trata-se de um estudo descritivo, transversal, prospectivo e retrospectivo, onde dados demográficos, clínicos e laboratoriais foram coletados após uma revisão minuciosa dos prontuários médicos durante o período pré-operatório ou após o TOF, e a coleta de células bucais da população total.

O estudo incluiu pacientes adultos com doença hepática terminal relacionada ao HCV com ou sem HCC, listados para transplante de fígado ou transplantados de maio de 2017 a julho de 2019, no HUWC e do HGF.

Os critérios de exclusão foram pacientes com idade inferior a 18 anos, dados incompletos ou ausência de dados, paciente inconsciente, recusa do paciente, HCC associado a disseminação metastática e malignidade extra-hepática.

Um total de 179 pacientes foram incluídos neste estudo com uma idade média de 61 anos (variação = 34-70). Todos foram diagnosticados com cirrose hepática crônica induzida pelo HCV, 105 deles (58,6%) complicados com HCC. A análise dos dados foi realizada em dois momentos: antes do período pré-transplante e após o TOF, com acompanhamento de 144 pacientes transplantados, veja o fluxograma descrito na **Figura 19**.

Figura 19. Fluxograma de participação no estudo.



Abreviações: TOF= transplante ortotópico de fígado; HCV= vírus de hepatite C; HCC= carcinoma hepatocelular.

Fonte Própria

3.3. Coleta e análise de dados

Os dados foram obtidos por meio de entrevistas realizadas por 2 pesquisadores previamente treinados para realizá-las, e registrados em questionários específicos, que, juntamente com os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), estão descritos nos **anexos 1 a 3**. Todos os pacientes foram voluntariamente entrevistados e submetidos à coleta de células bucais, com duração de no máximo 30 minutos. Dados adicionais foram coletados dos prontuários.

3.3.1. Anamnese

Cada paciente, após assinado o termo de consentimento livre e esclarecido de participação, respondeu ao entrevistador previamente treinado o questionário. A identificação de cada paciente foi realizada por código, sendo registrados os dados demográficos e antropométricos. Foram colhidos dados da história mórbida pregressa e social como diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, cardiopatias, doenças renais, portador de HCV com ou sem hepatocarcinoma, transfusões sanguíneas, tratamento para hepatite C, quimioembolização hepática, transplantados ou não, doenças virais, procedimentos cirúrgicos, tromboembolismo, internações prévias e seus motivos, hábitos, álcool, tabagismo e drogas ilícitas.

3.3.2. Dados coletados dos prontuários

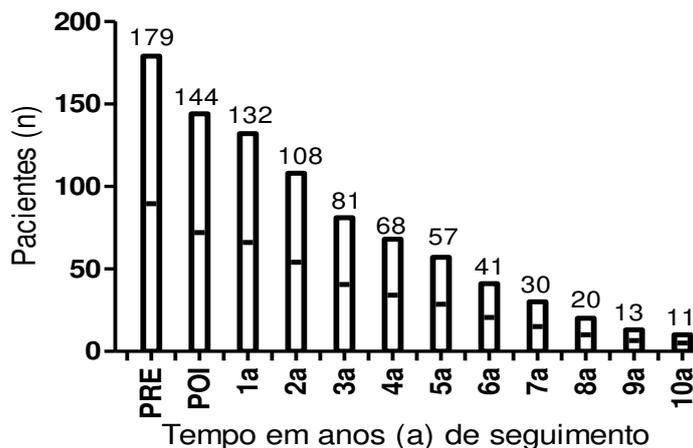
Os dados foram coletados após revisão dos prontuários de pacientes na lista de espera de transplante hepático e daqueles que foram transplantados até um período de 10 anos no pós do TOF (**Figura 20**), como:

- Marcador sorológico como o anti-HCV, para definição do agente e a pesquisa quantitativa de HCV-RNA, para identificar a presença do vírus.
- Marcadores de gravidade da cirrose hepática como escores MELD e o Child-Pugh.
- Alfa-fetoproteína: Para o estadiamento do tumor.
- Exames de imagem: Tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética e ultrassonografia, para identificação de tumor hepático e classificação conforme os critérios de Milão.

Obs. Todos os pacientes submetidos a TOF estavam dentro dos critérios de Milão, ou seja, aqueles que estavam na lista de espera fora dos critérios de Milão, foram submetidos à uma sessão ou mais de quimioembolização para redução do tumor e posteriormente foram submetidos ao transplante.

- Exames laboratoriais e bioquímicos: Hemograma, bilirrubinas, coagulograma, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), sódio, potássio, fosfatase alcalina, gama GT, albumina, ureia, creatinina, colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos.
- Biópsias hepáticas dos explantes e enxertos hepáticos, usando a escala de METAVIR e dos carcinomas hepatocelulares no perioperatório do TOF.

Figura 20. Distribuição dos pacientes do pré- e pós-TOF imediato, e seguimento até 10 anos após o TOF.



PRE, pré-operatório; POI, pós-operatório imediato.
Fonte: própria.

Analisamos a gravidade da doença hepática com diferentes critérios. Os casos menos graves foram identificados pelos seguintes escores: Milão (nódulo único < 5 cm ou até 3 nódulos < 3 cm) (MAZZAFERRO *et al.*, 1996), METAVIR (\leq A2 e \leq F2), MELD < 25, classificação AB de Child-Pugh e estadiamento com alfa-fetoproteína < 500 ng/ml; Os pacientes com doença hepática mais grave foram pontuados de acordo com os critérios expandidos de Milão da Universidade de São Francisco (1 nódulo \leq 6,5 cm; \leq 3 nódulos, cada \leq 4,5 cm com diâmetro total \leq 8 cm) (YAO *et al.*, 2001), escore METAVIR (A3 e \geq F3), MELD > 25, classificação Child-Pugh C e alfa-fetoproteína > 500 ng/ml.

3.3.3. Estadiamento do grau de fibrose hepática no pós-TOF

Para o estadiamento do grau de fibrose hepática no pós-TOF, além de biópsias hepáticas, também foram calculados os índices de APRI e FIB4, e considerado a classificação de METAVIR. O APRI e FIB4 foram calculados conforme as fórmulas, abaixo, respectivamente (STERLING *et al.*, 2006; YEN *et al.*, 2018):

$$\text{APRI} = [\text{AST (U/L)} / 35 (\text{ULN}^*)] / \text{plaquetas} \times 100$$

$$\text{FIB4} = (\text{Idade} \times \text{AST}) / (\text{Platelets} \times \sqrt{\text{ALT}})$$

- APRI (índice da relação de aspartato aminotransferase (AST) sobre plaquetas).

- APRI <0,5: Fibrose de Probabilidade F0-F1 de 72,7% *

- APRI > 1.5: Fibrose de Probabilidade F3-F4 de 54,2%*

* Nos estudos de validação.

ULN: O limite superior da AST normal é estimado a 35

- Fibrosis-4 (FIB4) - índice para fibrose hepática.

- Fibrose F0-F1 (FIB4 < 1,45), F2 (FIB4 > 1,45 e < 3,25), F3-F4 (FIB4 > 3,25)

- Classificação de METAVIR.

F0 = sem fibrose

F1 = fibrose portal sem septos

F2 = fibrose portal com poucos septos

F3 = numerosos septos sem cirrose

F4 = cirrose. (STERLING *et al.*, 2006).

3.3.4. Polimorfismo genético

As amostras de células bucais para a genotipagem da APOE foram colhidas no pré-operatório ou após o TOF, e depois foram identificadas somente por código, permanecendo o sigilo de informações do paciente.

O método de coleta de células bucais tem importância por ser uma fonte não invasiva, um método simples e eficaz para a realização da extração de ácido desoxirribonucleico (DNA), para posterior realização da genotipagem em variados estudos, com vantagem, por não oferecer riscos e não causar dor ao examinado.

As coletas de células bucais para extração de DNA foram obtidas dos pacientes na fila de espera de transplante hepático e aqueles que foram transplantados de fígado, durante as consultas de rotina no ambulatório de TOF do HUWC e HGF, por dois pesquisadores previamente treinados para realização dessa coleta, orientando os pacientes quanto às instruções durante a coleta, que seguiu o protocolo sugerido no kit para purificação de DNA utilizando uma escova bucal estéril (*cytobrush*), sugerido pela Gentra Puregene® (Qiagen® - Gentra System, Minneapolis MN).

O procedimento inicial para coleta de células bucais foi raspar o interior da boca 10 vezes com a escova bucal estéril, por pelo menos, uma hora após comer ou beber algo. O DNA poder ser purificado imediatamente após a coleta ou ser armazenado na própria escova por até um mês a temperatura ambiente (15 a 25°C). Assim, como não foi possível a realização da extração de DNA imediatamente após a coleta, o armazenamento foi realizado em temperatura controlada, a 4°C em geladeira. As amostras foram colocadas dentro de microtubos de centrífuga de 1,5 mL, com 300 µL de solução de lise celular em cada ou até um pouco mais, dependendo se a escova estava totalmente imersa dentro da solução.

O DNA de amostras de células bucais foi extraído utilizando o protocolo modificado Gentra Puregene (Gentra System, Minneapolis MN), a partir de etapas de lise celular, tratamento com ribonuclease (RNAse), precipitação de proteínas, precipitação do DNA e hidratação do DNA (LONDON *et al.*, 2001).

Como cada tubo já continha a escova bucal pós-coleta imersa em 300 µL de solução de lise, foi adicionado 1,5 µL de proteinase K (20 mg/ml), sendo retiradas

após incubação por 55°C por 1 h. As escovas foram, então, retiradas e adicionou-se 100 µL de solução de precipitação de proteína. As escovas retiradas foram armazenadas em outro microtubo, mantendo um microtubo de estoque.

Foi acrescido 1,5 µL de solução de RNase, misturando suavemente e incubando por 15 min a 37°C, sendo, depois, colocado 1 min no gelo, para resfriar rapidamente. Após essa etapa, foram adicionados 100 µL de solução de precipitação de proteínas e agitado fortemente por 20 s em alta velocidade, sendo, posteriormente, incubados por 5 min no gelo. Após centrifugar por 3 min a 15.000xg, as proteínas formaram um pellet sedimentado no fundo do microtubo. O sobrenadante foi desprezado e o tubo invertido sobre papel absorvente, e em seguida foram adicionados 300 µl de etanol 70% para lavagem do DNA.

Os tubos permaneceram abertos por 15 min para evaporação do etanol residual e, a seguir, o DNA foi dissolvido em 20 µl de solução de hidratação do DNA, e armazenado até a análise de genotipagem em congelador a -20°C, devidamente identificados com o código do paciente.

As extrações de DNA foram realizadas no Laboratório de Biologia da Cicatrização, Ontogenia e Nutrição de Tecidos (LABICONTE) do Centro de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará.

A descrição dos primers iniciadores oligonucleotídeos da sequência APOE humana para a frente e reversos e seus nucleotídeos de extremidade 3', utilizados nesse estudo estão descritos na **Tabela 7**.

Tabela 7. Sequência de primers da APOE humana.

Primers	Orientação	Sequência Nucleotídica 5'-3'	Temperatura (°C)	% Guanosina + Citosina	Comprimento (pb)
APOE_112C	Forward	CGGACATGGAGGACGTGT	68	61	18
APOE_112R	Forward	CGGACATGGAGGACGTGC	59,6	67	18
APOE_158C	Reverse	CTGGTACTGCCAGGCA	68	61	18
APOE_158R	Reverse	CTGGTACTGCCAGGCG	69	67	18

Fonte própria

A genotipagem da APOE de cada participante foi detectado por reação de cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR), por meio da amplificação de um sinal fluorescente, que podem estar intercalados na dupla fita do DNA amplificado (SYBR®

Green), utilizando o método experimental de quantificação (Δ CT) (CALERO *et al.*, 2009).

Os primers foram combinados em três misturas de reação para produzir uma amplificação: Reação APOE2" (primers APOE_112C e APOE_158C); Reação APOE3" (primers APOE_112C e APOE_158R) e Reação APOE4" (primers APOE_112R e APOE_158R) (CALERO *et al.*, 2009). Cada mistura da reação de PCR continha: 2 x SYBR Green Master mix: 10 μ l; primer forward: 1 μ l; primer reverse: 1 μ l; H₂O livre de DNA: 7 μ l e DNA: 1 μ l; totalizando: 20 μ l. Controles negativos foram realizados usando as mesmas misturas de reação sem DNA. Todas as reações foram executadas em duplicata.

O protocolo de amplificação do PCR foi: AmpliTaq Gold DNA Polymerase inicial - ativação a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos com desnaturação a 95 °C por 15 s, anelagem a 62 °C por 30 s e extensão a 62 °C por 30 s (CALERO *et al.*, 2009). A amplificação foi realizada em um LightCycler® Nano em Real Time PCR System com 32 poços.

O limiar do ciclo ou valor de Ct, que corresponde ao número do ciclo em que a quantidade de fluorescência atinge um determinado nível, indicando que a amostra é positiva, sendo que quanto menor é o valor de Ct, melhor é a expressão dos genótipos foi selecionado como a leitura de PCR em Tempo Real para a análise dos resultados da genotipagem. A presença ou ausência de alelos foi analisada por amplificação a partir das configurações específicas de amplificação para os alelos E2, E3 ou E4. Por exemplo, um APOE E3/E4 heterozigótico produziu valores de Ct para "Reação APOE3" e "Reação APOE4" significativamente menores (Δ Ct \geq 5 ciclos) em comparação com "Reação APOE2". Considerando que, um APOE E3/E3 homozigótico identificou um valor de Ct para "Reação APOE3" significativamente menor do que o Ct obtido para as outras duas reações. Se os valores mais baixos de Ct não estavam na faixa desejada ($15 \leq \Delta$ Ct \leq 25 ciclos), o ensaio foi considerado insuficiente. Valores de Ct menores que 25 indicaram uma reação de amplificação positiva (CALERO *et al.*, 2009).

A maioria das amostras do presente estudo foi analisada com Ct < 25, identificando três grupos de genótipos como: APOE2 (portadores dos genótipos E2/E2

e E2/E3), APOE3 (portadores do genótipo E3/E3) e APOE4 (portadores dos genótipos E3/E4 e E4/E4) (PETKEVICIENE *et al.*, 2012).

3.3.5 Análises estatísticas

Os dados foram analisados com o software estatístico SPSS (SPSS, Inc., EUA) e com o GraphPad Prism versão 7.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). Para a normalidade foram realizados os testes de D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk. Calculou-se a média \pm desvio padrão para as variáveis contínuas. As frequências alélicas foram determinadas contando diferentes alelos e calculando suas proporções. As características demográficas foram descritas em termos de taxas e porcentagens. Análises de tabelas de contingência foram utilizadas para investigar variáveis categóricas usando o teste do χ^2 corrigido pelo teste exato de Fisher. Análises de regressão e correlação multilíneas foram realizadas para evitar outros fatores de confusão em potencial e buscar variáveis independentes significativas associadas aos efeitos da APOE na lesão hepática. O teste ANOVA unidirecional ou bidirecional, seguido pelo teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis e Dunn's, foram utilizados para comparações múltiplas, quando necessário. $P < 0,05$ foi estatisticamente significativa.

3.3.6 Considerações éticas

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC), protocolo no. 2.018.768 e do protocolo HGF no. 2.062.278. Todos os pacientes foram abordados pela equipe de pesquisa, que explicou o protocolo do estudo e esclareceu que a não participação do estudo não causaria descontinuação dos cuidados ou tratamento médico. Depois disso, os pacientes leram e assinaram o termo de consentimento informado (**Anexos 4 e 5**).

4. RESULTADOS

4.1. Perfil demográfico e clínico

Um total de 179 pacientes diagnosticados com cirrose hepática crônica por HCV associada ou não ao HCC, tratados ou não com antivirais, foram incluídos dos ambulatórios de transplante de fígado do HUWC ou HGF, de maio de 2017 a julho de 2019, dos quais 35 eram candidatos a TOF e 144 receberam transplante de fígado.

4.1.1. Análise estatística de dados do pré-TOF de toda a população

Exceto pela carga viral, obtida no pré- ou pós-TOF, os demais dados demográficos e clínicos foram coletados apenas de pacientes que estavam na lista de espera para transplante. Uma maior porcentagem de pacientes foi curada para o HCV (sorologia negativa), após o tratamento com terapia antiviral. Entre esses portadores não-APOE2, a presença de pacientes com sorologia positiva para o HCV foi menos encontrada quando comparado com aqueles com sorologia negativa ($p=0,006$). A infecção pelo genótipo 1 do HCV foi mais prevalente (61,9%), seguida pelo genótipo 3 (35,7%) e pelo genótipo 2 (2,4%) na população geral. Os portadores de APOE2 e APOE4 também apresentaram alta frequência do genótipo 1 do HCV (**Tabela 8**). Quanta à diferenciação histológica de biópsias do HCC, o tipo moderadamente diferenciado foi mais frequente (58,9%), seguido pelo pouco diferenciado (34,2%). Em pacientes portadores não-APOE4, a frequência do HCC do tipo pouco diferenciado foi significativamente maior quando comparado ao bem diferenciado ($p=0,028$) (**Tabela 9**). Nenhuma diferença estatística foi encontrada em outras comparações.

A frequência do alelo APOE de acordo com a etiologia da cirrose hepática, sorologia do HCV e a carga viral da população total estão representadas na **Tabela 10**. A frequência dos alelos E3 e E4 da APOE foi de (67,3%) e (15,6%), respectivamente. A frequência do alelo E2 foi surpreendentemente alta (17,1%). O genótipo mais frequente na população total foi E3/E3 (92 de 179) (51,4%). Não foi encontrada diferença estatística nos alelos e genótipos de APOE em relação à etiologia da cirrose, carga viral e severidade da inflamação hepática pelo escore de METAVIR.

Tabela 8. Perfil demográfico e clínico dos pacientes candidatos a TOF conforme a estratificação dos alelos E2 e E4

Variáveis	Pacientes (n=179)	APOE2		p	APOE4		p
		Sim n=46	Não n=133		Sim n=47	Não n=132	
Idade (anos) (Média ± DP)	60,34 ± 7,16	60,8 ± 7,26	60,2 ± 7,18	0,717	60,3 ± 7,44	60,3 ± 7,08	0,875
Gênero n (%)							
Masculino	145 (81,0)	76 (26,2)	214 (73,8)	0,758	74 (25,5)	216 (74,5)	0,541
Feminino	34 (19,0)	16 (23,5)	52 (76,5)		20 (29,4)	48 (70,6)	
IMC (Média ± DP)	26,8 ± 4,88	27,6 ± 4,36	26,5 ± 5,03	0,132	27,0 ± 4,81	26,7 ± 4,92	0,506
Etiologia n (%)							
HCV	74 (41,3)	36 (24,3)	112 (75,7)	0,713	46 (31,1)	102 (68,9)	0,089
HCV + HCC	105 (58,7)	56 (26,7)	154 (73,3)		48 (22,9)	162 (77,1)	
Carga viral n (%)							
HCV +	34 (19,2)	28 (41,2)	40 (58,8)	0,006	16 (23,5)	52 (76,5)	0,876
HCV -	143 (80,8)	68 (23,8)	218 (76,2)		72 (25,2)	214 (74,8)	
MELD n (%)							
< 25	157 (88,7)	78 (24,8)	236 (75,2)	0,563	84 (26,8)	230 (73,2)	1,000
≥ 25	20 (11,3)	12 (30,0)	28 (70,0)		30 (75,0)	10 (25,0)	
Child-Pugh n (%)							
A e B	131 (76,2)	68 (25,9)	194 (74,1)	0,885	72 (27,5)	190 (72,5)	0,669
C	41(23,8)	20 (24,4)	62 (75,6)		20 (24,4)	62 (75,6)	
Child-Pugh n (%)							
A	55 (57,3)	30 (27,3)	80 (72,7)	0,740	34 (30,9)	76 (69,1)	0,336
C	41(42,7)	20 (24,4)	62 (75,6)		20 (24,4)	62 (75,6)	
Genótipo HCV n (%)							
1	78 (61,9)	34 (51,5)	122 (65,6)	0,129	48 (70,6)	108 (58,7)	0,175
2	3 (2,4)	2 (3,0)	4 (2,2)		2 (2,9)	4 (2,2)	
3	45 (35,7)	30 (45,5)	60 (32,2)		18 (26,5)	72 (39,1)	

Teste de Mann-Whitney, teste exato de Fisher e qui-quadrado. DP= desvio padrão; n= frequências alélicas. ^{a,b,c}estatisticamente significativa (p<0,05). APOE= Apolipoproteína E; IMC= índice de massa corporal; HCV= vírus de hepatite C; MELD= modelo para doença hepática em estágio terminal.

Tabela 9. Características clínicas e histológica do carcinoma hepatocelular dos pacientes candidatos a TOF conforme a estratificação dos alelos E2 e E4

Variáveis para HCC	Pacientes (n=179)	APOE2		p	APOE4		p
		Sim n=46	Não n=133		Sim n=47	Não n=132	
Critérios de Milão n (%)							
Dentro dos critérios	84 (79,2)	44 (26,2)	124 (73,8)	0,850	38 (22,6)	130 (77,4)	0,551
Fora dos critérios	22 (20,8)	12 (27,3)	32 (72,7)		12 (27,3)	32 (72,7)	
Marcador HCC n (%)							
AFP <500	92 (90,2)	46 (25,0)	138 (75,0)	0,182	38 (20,7)	146 (79,3)	0,389
AFP ≥ 500	10 (9,8)	8 (40,0)	12 (60,0)		6 (30,0)	14 (70,0)	
Diferenciação histológica do HCC n (%)							
Bem diferenciado	3 (4,2)	0 (0,0)	6 (100,0)	0,309	4 (66,7) ^a	2 (33,3)	0,028
Moderadamente diferenciado	43 (58,9)	22 (25,6)	64 (74,4)		24 (27,9)	62 (72,1)	
Pouco diferenciado	25 (34,2)	10 (20,0)	40 (80,0)		8 (16,0)	42 (84,0) ^b	
Indiferenciado / anaplásico	2 (2,7)	0 (0,0)	4 (100,0)		2 (50,0)	2 (50,0)	

Teste de Mann-Whitney, teste exato de Fisher e qui-quadrado. DP= desvio padrão; n= frequências alélicas.

^{a,b}estatisticamente significativa (p<0,05).

APOE= Apolipoproteína E; HCC= carcinoma hepatocelular; AFP= alfa-fetoproteína.

Tabela 10. Distribuição genotípica e alélica da apolipoproteína E de acordo com a etiologia da cirrose, sorologia para HCV e carga viral da população total.

APOE Genótipos	Todos n (179)	Etiologia de Cirrose		HCV-RNA		METAVIR		Extremo METAVIR	
		HCV n (74)	HCV + HCC n (105)	+ n (34)	- n (143)	≤ A2F4 n (80)	A3F4 n (11)	A1F4 n (27)	A3F4 n (11)
E2/E2	15 (8,4)	6 (8,1)	9 (8,6)	2 (5,9)	13 (9,1)	9 (11,2)	1 (9,1)	4 (14,8)	1 (9,1)
E2/E3	25 (14,0)	9 (12,2)	16 (15,2)	11 (32,4)	16 (11,2)	11 (13,8)	2 (18,2)	4 (14,8)	2 (18,2)
E2/E4	6 (3,3)	3 (4,1)	3 (2,9)	1 (2,9)	5 (3,5)	2 (2,5)	0 (0,0)	1 (3,7)	0 (0,0)
E3/E3	92 (51,4)	36 (48,6)	56 (53,3)	13 (38,2)	78 (54,5)	39 (48,8)	8 (72,7)	12 (44,5)	8 (72,7)
E3/E4	32 (17,9)	15 (20,3)	17 (16,2)	5 (14,7)	24 (16,8)	14 (17,5)	0 (0,0)	3 (11,1)	0 (0,0)
E4/E4	9 (5,0)	5 (6,7)	4 (3,8)	2 (5,9)	7 (4,9)	5 (6,2)	0 (0,0)	3 (11,1)	0 (0,0)
APOE Alelos	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
E2	61 (17,1)	24 (16,2)	37 (17,6)	16 (23,5)	47 (16,4)	31 (19,4)	4 (18,2)	13 (24,1)	4 (18,2)
E3	241 (67,3)	96 (64,9)	145 (69,1)	42 (61,8)	196 (68,5)	103 (64,4)	18 (81,8)	31 (57,4)	18 (81,8)
E4	56 (15,6)	28 (18,9)	28 (13,3)	10 (14,7)	43 (15,1)	26 (16,2)	0(0,0)	10 (18,5)	0(0,0)
Todos	358	148	210	68	286	160	22	54	22

n= frequências alélicas.

APOE= Apolipoproteína E; HCV= vírus da hepatite C; HCC= carcinoma hepatocelular.

Comparamos a inflamação hepática dos explantes e biópsias hepáticas dos pacientes pré-TOF conforme os alelos E2 e E4, incluindo aqueles tratados com terapia antiviral no pré e/ou pós-TOF. A frequência de pacientes portadores do alelo E2 com um grau mínimo de inflamação (A1), tratados no pós-TOF com antivirais, foi significativamente menor ($p=0,013$) quando comparados a aqueles tratados com antivirais no pré-TOF. Em portadores não-E4 com um grau mínimo de inflamação (A1), o tratamento do HCV com antivirais foi significativamente maior nos pacientes no pré-TOF ($p=0,023$) quando comparados ao tratamento com antivirais no pós-TOF. Em pacientes não-E2 com um grau mínimo e moderado de inflamação (A1A2), o tratamento do HCV com antivirais foi significativamente maior no pós-TOF ($p=0,042$). Além disso, todos os pacientes com inflamação hepática avançada (A3) foram tratados com antivirais no pós-TOF (**Tabela 11**).

Em seguida, comparamos pacientes no pós-TOF com fibrose hepática tratados com antivirais no pré e/ou pós-TOF. No entanto, de acordo com a estratificação dos alelos E2 e E4, não houve diferença estatística entre os pacientes tratados ou não com terapia antiviral no pós-TOF quando comparados a aqueles tratados com antivirais no pré-TOF. No entanto, os pacientes que evoluíram para fibrose moderada (METAVIR F2), no seguimento pós-TOF, foram tratados com terapia antiviral somente no período pós-TOF (**Tabela 11**).

As frequências alélicas da APOE foram associadas à inflamação hepática categorizada pelo escore de METAVIR (leve/moderado \leq A2F4 versus severo (A3F4) e METAVIR extremo: A1F4 versus A3F4), de biópsias de 89 explantes hepáticos e de 2 pacientes com cirrose hepática aguardando na fila de TOF. O grau de inflamação severa categorizado pelo escore de METAVIR [\leq A2F4, 80 (87,9%) versus A3F4, 11 (12,1%); $p=0,003$] e METAVIR extremo [A1F4, 27 (71,1%) versus A3F4, 11 (28,9%); $p=0,007$], foi significativamente menos frequente nos pacientes portadores do alelo APOE4 (**Tabela 11**). Esses resultados também foram significantes naqueles pacientes portadores do alelo APOE4, com doença hepática menos grave (MELD \leq 25), categorizados pelo escore de METAVIR [\leq A2F4, 80 (88.9%) versus A3F4, 10 (11.1%); $p=0.004$] and METAVIR extremo [A1F4, 27 (73.0%) versus A3F4, 10 (27.0%); $p=0.012$] (**Tabela 14**).

Tabela 11. Pacientes tratados com terapia antiviral para HCV infecção no pré ou pós-TOF, e escore de METAVIR para estadiamento da inflamação no pré-TOF; em ambos os dados conforme a estratificação dos alelos E2 e E4.

Variáveis	APOE2		p	APOE4		p
	Sim	Não		Sim	Não	
Tratados em pré- e/ou pós-TOF e grau de inflamação pré-TOF.	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
METAVIR A1 pré-TOF (n=9) pós-TOF (n=8)	10 (83,3) 2 (16,7)	8 (36,4) 14 (63,6)	0,013	2 (20,0) 8 (80,0)	16 (66,7) 8 (33,3)	0,023
METAVIR A1A2 pré-TOF (n=19) pós-TOF (n=42)	14 (46,7) 16 (53,3)	24 (26,1) 68 (73,9)	0,042	6 (17,6) 28 (82,4)	32 (36,4) 56 (63,6)	0,052
METAVIR A3 pré-TOF (n=0) pós-TOF (n=11)	0 (0,0) 6 (100,0)	0 (0,0) 16 (100,0)	NA	0 (0,0) 0 (0,0)	0 (0,0) 22 (100,0)	NA
Tratados em pré- e/ou pós-TOF e seguimento de fibrose no pós-TOF.	n (%)	n (%)	p	n (%)	n (%)	p
METAVIR F0F1 pré-TOF (n=23) pós-TOF (n=99)	4 (9,5) 38 (90,5)	12 (9,1) 120 (90,9)	1,000	2 (3,8) 50 (96,2)	14 (11,5) 108 (88,5)	0,154
METAVIR F2 pré-TOF (n=0) pós-TOF (n=8)	0 (0,0) 0 (0,0)	0 (0,0) 16 (100,0)	NA	0 (0,0) 4 (100,0)	0 (0,0) 12 (100,0)	NA
METAVIR F3F4 pré-TOF (n=2) pós-TOF (n=5)	2 (50,0) 2 (50,0)	2 (20,0) 8 (80,0)	0,520	0 (0,0) 2 (100,0)	4 (33,3) 8 (66,7)	1,000
Escore de METAVIR para estadiamento de inflamação hepática no pré-TOF.	n (%)	n (%)	P	n (%)	n (%)	p
METAVIR extremo A1F4 (n=27) A3F4 (n=11)	18 (75,0) 6 (25,0)	36 (69,2) 16 (30,8)	0,787	14 (100,0) 0 (0,0)	40 (64,5) 22 (35,5)	0,007
METAVIR ≤ A2F4 (n=80) A3F4 (n=11)	44 (88,0) 6 (12,0)	116 (87,9) 16 (12,1)	1,000	42 (100,0) 0 (0,0)	118 (84,3) 22 (15,7)	0,003

As análises foram realizadas pelo teste exato de Fisher e teste de Mann-Whitney; DP= desvio padrão; n = frequências alélicas.

APOE = gene da apolipoproteína E; METAVIR A1= grau mínimo de inflamação; METAVIR A1A2= grau mínimo e moderado de inflamação; METAVIR A3= alto grau de inflamação; METAVIR F0F1= baixo grau de fibrose; METAVIR F2= grau moderado de fibrose; METAVIR F3F4= alto grau de fibrose; METAVIR F4= cirrose; NA= não aplicável.

Os achados dos escores de Child-Pugh de pacientes no pré-TOF, conforme a estratificação dos alelos E2 e E4, estão descritos nas **Tabelas 12 e 13**. Entre os pacientes portadores do alelo E2 e com escores de Child-Pugh A (baixa gravidade), a frequência dos níveis séricos de LDL-colesterol de alto risco (≥ 100 mg/dL) foi significativamente superior quando comparados com níveis séricos de LDL-colesterol de baixo risco (< 100 mg/dL) ($p=0,003$). Em outras análises, em pacientes portadores do alelo E4 e com escores de Child-Pugh A (baixa gravidade), a frequência dos níveis séricos de triglicerídeos de baixo risco (<150 mg/dL) foi significativamente superior que aqueles com níveis séricos de triglicerídeos de alto risco (≥ 150 mg/dL) ($p=0,006$).

Em pacientes portadores do alelo E2 e com escores de Child-Pugh B (moderado), a frequência de níveis séricos de alfa-fetoproteína mais baixos (AFP < 500 mg/dL) foi significativamente superior quando comparado com níveis séricos elevados (AFP ≥ 500 mg/dL) ($p=0,004$). Entre os pacientes portadores do alelo E2 e com escores de Child-Pugh C (alta gravidade), a frequência de pacientes obesos foi significativamente menor quando comparados a aqueles com sobrepeso ($p=0,025$). Além disso, em pacientes portadores do alelo E4 e com escores de Child-Pugh C (alta gravidade), a frequência de pacientes obesos foi significativamente superior quando comparados a aqueles com IMC dentro da normalidade (eutrófico) ($p=0,022$) (**Tabelas 12 e 13**).

Os resultados dos escores de MELD de pacientes no pré-TOF, conforme a estratificação dos alelos E2 e E4 são mostrados na **Tabela 14**. Em pacientes com escores de MELD ≤ 25 (gravidade leve-moderada) e portadores do alelo E2, a frequência dos níveis séricos de LDL de alto risco (≥ 100 mg/dL) foi significativamente maior quando comparado com níveis séricos de baixo risco (< 100 mg/dL) ($p=0,006$). Entre os pacientes com escores MELD > 25 (alta gravidade) e portadores do alelo E4, a frequência de pacientes com níveis séricos de colesterol total de alto risco (≥ 200 mg/dL) foi significativamente alto que aqueles com níveis séricos de baixo risco (< 200 mg/dL) ($p=0,050$). Em outras análises, entre os pacientes com escores MELD > 25 (alta gravidade) e portadores não-E4, a frequência de pacientes obesos foi significativamente menor quando comparados a aqueles com IMC dentro da normalidade (eutrófico) e sobrepeso ($p=0,001$).

Tabela 12. Associação do escore Child-Pugh e variáveis em pacientes pré-TOF de acordo com o alelo E2.

Variáveis	Child-Pugh A		P	Child-Pugh B		p	Child-Pugh C		p
	APOE2			APOE2			APOE2		
	Sim n (%)	Não n (%)		Sim n (%)	Não n (%)		Sim n (%)	Não n (%)	
IMC									
Eutrófico (n=59)	10 (33,3)	36 (45,0)	0,372	10 (23,8)	42 (36,8)	0,306	4 (22,2)	16 (26,7)	0,025
Sobrepeso (n=73)	14 (46,7)	26 (32,5)		20 (47,6)	44 (38,6)		14 (77,8) ^a	28 (46,6)	
Obesidade (n=40)	6 (20,0)	18 (22,5)		12 (28,6)	28 (24,6)		0 (0,0)	16 (26,7) ^b	
Marcador HCC									
AFP <500 (n=138)	30 (100,0)	70 (92,1)	0,181	28 (82,4)	92 (97,9)	0,004	14 (100,0)	42 (100,0)	NA
AFP ≥ 500 (n=7)	0 (0,0)	6 (7,9)		6 (17,6)	2 (2,1)		0 (0,0)	0 (0,0)	
METAVIR extremo									
A1F4 (n=27)	12 (100,0)	16 (88,9)	0,503	6 (50,0)	18 (75,0)	0,157	0 (0,0)	2 (33,3)	NA
A3F4 (n=9)	0 (0,0)	2 (11,1)		6 (50,0)	6 (25,0)		0 (0,0)	4 (66,7)	
METAVIR									
≤ A2F4 (n=78)	22 (100,0)	52 (96,3)	1,000	18 (75,0)	46 (88,5)	0,178	4 (100,0)	14 (77,8)	0,554
A3F4 (n=9)	0 (0,0)	2 (3,7)		6 (25,0)	6 (11,5)		0 (0,0)	4 (22,2)	
Colesterol total									
< 200 mg/dL (n=63)	16 (66,7)	30 (78,9)	0,374	24 (92,3)	40 (90,9)	1,000	4 (100,0)	12 (85,7)	1,000
≥ 200 mg/dL (n=12)	8 (33,3)	8 (21,1)		2 (7,7)	4 (9,1)		0 (0,0)	2 (14,3)	
HDL colesterol									
< 40 ♀ e 50 ♂ (n=41)	12 (50,0)	16 (47,1)	1,000	14 (77,8)	26 (61,9)	0,370	2 (50,0)	12 (85,7)	0,197
≥ 40 ♀ e 50 ♂ (n=27)	12 (50,0)	18 (52,9)		4 (22,2)	16 (38,1)		2 (50,0)	2 (14,3)	
LDL colesterol									
< 100 mg/dL (n=32)	4 (25,0)	18 (75,0)	0,003	10 (62,5)	24 (63,2)	1,000	0 (0,0)	8 (57,1)	0,091
≥ 100 mg/dL (n=24)	12 (75,0)	6 (25,0)		6 (37,5)	14 (36,8)		4 (100,0)	6 (42,9)	
Triglicérides									
< 150 mg/dL (n=59)	14 (58,3)	30 (78,9)	0,094	20 (76,9)	38 (86,4)	0,341	4 (100,0)	12 (85,7)	1,000
≥ 150 mg/dL (n=16)	10 (41,7)	8 (21,1)		6 (23,1)	6 (13,6)		0 (0,0)	2 (14,3)	

Teste exato de Fisher e teste do qui-quadrado; n= frequências alélicas; ^{a,b}estatisticamente significativo (p <0,05).

Frequências dos Alelos APOE= Apolipoproteína E; IMC= índice de massa corporal; HCC= carcinoma hepatocelular; AFP= alfa-fetoproteína; METAVIR F4= cirrose; METAVIR A1= grau mínimo de inflamação; METAVIR A1A2= grau mínimo e moderado de inflamação; METAVIR A3= alto grau de inflamação; HDL= lipoproteínas de alta densidade; LDL= lipoproteína de baixa densidade; NA= não aplicável.

Tabela 13. Associação do escore Child-Pugh e variáveis em pacientes pré-TOF de acordo com o alelo E4.

Variáveis	Child-Pugh A		P	Child-Pugh B		p	Child-Pugh C		p
	APOE4			APOE4			APOE4		
	Sim n (%)	Não n (%)		Sim n (%)	Não n (%)		Sim n (%)	Não n (%)	
IMC									
Eutrófico (n=59)	10 (29,4)	36 (47,4)	0,180	14 (36,8)	38 (32,2)	0,815	2 (10,0) ^a	18 (31,0)	0,022
Sobrepeso (n=73)	16 (47,1)	24 (31,6)		14 (36,8)	50 (42,4)		10 (50,0)	32 (55,2)	
Obesidade (n=40)	8 (23,5)	16 (21,0)		10 (26,4)	30 (25,4)		8 (40,0)	8 (13,8) ^b	
Marcador HCC									
AFP <500 (n=138)	30 (93,7)	70 (94,6)	1,000	28 (100,0)	92 (92,0)	0,199	12 (100,0)	44 (100,0)	NA
AFP ≥ 500 (n=7)	2 (6,3)	4 (5,4)		0 (0,0)	8 (8,0)		0 (0,0)	0 (0,0)	
METAVIR extremo									
A1F4 (n=27)	8 (100,0)	20 (90,9)	1,000	6 (100,0)	18 (60,0)	0,079	0 (0,0)	2 (33,3)	NA
A3F4 (n=9)	0 (0,0)	2 (9,1)		0 (0,0)	12 (40,0)		0 (0,0)	4 (66,7)	
METAVIR									
≤ A2F4 (n=78)	22 (100,0)	52 (96,3)	1,000	14 (100,0)	50 (80,6)	0,108	4 (100,0)	14 (77,8)	0,554
A3F4 (n=9)	0 (0,0)	2 (3,7)		0 (0,0)	12 (19,4)		0 (0,0)	4 (22,2)	
Colesterol total									
< 200 mg/dL (n=63)	10 (71,4)	36 (75,0)	0,743	12 (85,7)	52 (92,9)	0,592	6 (75,0)	10 (100,0)	0,183
≥ 200 mg/dL (n=12)	4 (28,6)	12 (25,0)		2 (14,3)	4 (7,1)		2 (25,0)	0 (0,0)	
HDL colesterol									
< 40 ♀ e 50 ♂ (n=41)	4 (33,3)	24 (52,2)	0,336	12 (85,7)	28 (60,9)	0,112	6 (75,0)	8 (80,0)	1,000
≥ 40 ♀ e 50 ♂ (n=27)	8 (66,7)	22 (47,8)		2 (14,3)	18 (39,1)		2 (25,0)	2 (20,0)	
LDL colesterol									
< 100 mg/dL (n=32)	2 (33,3)	20 (58,8)	0,381	8 (57,1)	26 (65,0)	0,749	4 (50,0)	4 (40,0)	1,000
≥ 100 mg/dL (n=24)	4 (66,7)	14 (41,2)		6 (42,9)	14 (35,0)		4 (50,0)	6 (60,0)	
Triglicérides									
< 150 mg/dL (n=59)	14 (100,0)	30 (62,5)	0,006	10 (71,4)	48 (85,7)	0,240	6 (75,0)	10 (100,0)	0,183
≥ 150 mg/dL (n=16)	0 (0,0)	18 (37,5)		4 (28,6)	8 (14,3)		2 (25,0)	0 (0,0)	

Teste exato de Fisher e teste do qui-quadrado; n= frequências alélicas; ^{a,b}estatisticamente significativo (p <0,05).

APOE= Apolipoproteína E; IMC= índice de massa corporal; HCC= carcinoma hepatocelular; AFP= alfa-fetoproteína; METAVIR F4= cirrose; METAVIR A1= grau mínimo de inflamação; METAVIR A1A2= grau mínimo e moderado de inflamação; METAVIR A3= alto grau de inflamação; HDL= lipoproteínas de alta densidade; LDL= lipoproteína de baixa densidade; NA= não aplicável.

Tabela 14. Associação do escore MELD e variáveis em pacientes pré-TOF de acordo com os alelos E2 e E4.

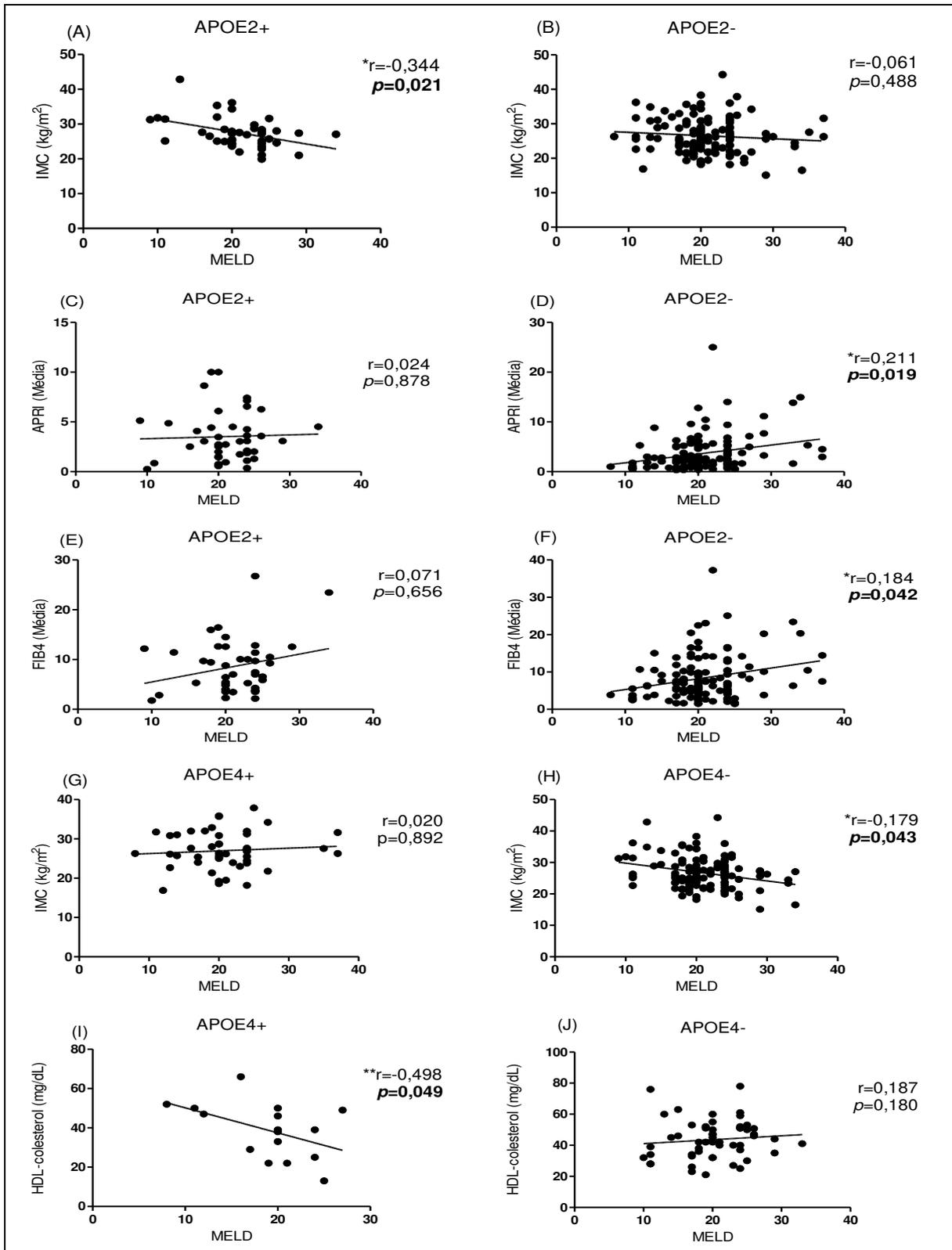
Variáveis	MELD ≤ 25		p	MELD > 25		p	MELD ≤ 25		p	MELD > 25		p
	APOE2			APOE2			APOE4			APOE4		
	Sim n (%)	Não n (%)		Sim n (%)	Não n (%)		Sim n (%)	Não n (%)		Sim n (%)	Não n (%)	
IMC												
Eutrófico (n=60)	20 (25,0)	82 (35,1)	0,105	4 (40,0)	14 (50,0)	0,270	24 (28,6)	78 (33,9)	0,553	2 (20,0) ^a	16 (57,1)	0,001
Sobrepeso (n=75)	42 (52,5)	92 (39,3)		6 (60,0)	10 (35,7)		36 (42,8)	98 (42,6)		4 (40,0) ^a	12 (42,9)	
Obeso (n=41)	18 (22,5)	60 (25,6)		0 (0,0)	4 (14,3)		24 (28,6)	54 (23,5)		4 (40,0)	0 (0,0) ^b	
Marcador HCC												
AFP <500 (n=142)	64 (91,4)	196 (96,1)	0,203	8 (100,0)	16 (100,0)	NA	68 (97,1)	192 (94,1)	0,530	4 (100,0)	20 (100,0)	NA
AFP ≥ 500 (n=7)	6 (8,6)	8 (3,9)		0 (0,0)	0 (0,0)		2 (2,9)	12 (5,9)		0 (0,0)	0 (0,0)	
METAVIR extreme												
A1F4 (n=27)	14 (70,0)	30 (68,2)	1,000	4 (100,0)	6 (100,0)	NA	12 (100,0)	32 (61,5)	0,012	2 (100,0)	8 (100,0)	NA
A3F4 (n=10)	6 (30,0)	14 (31,8)		0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	20 (38,5)		0 (0,0)	0 (0,0)	
METAVIR												
≤ A2F4 (n=80)	38 (86,4)	102 (87,9)	0,792	6 (100,0)	14 (100,0)	NA	38 (100,0)	102 (83,6)	0,004	4 (100,0)	16 (100,0)	NA
A3F4 (n=10)	6 (13,6)	14 (12,1)		0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	20 (16,4)		0 (0,0)	0 (0,0)	
Colesterol total												
< 200 mg/dL (n=64)	40 (83,3)	76 (84,4)	1,000	4 (66,7)	8 (80,0)	0,604	28 (82,4)	88 (84,6)	0,789	0 (0,0)	12 (85,7)	0,050
≥ 200 mg/dL (n=13)	8 (16,7)	14 (15,6)		2 (33,3)	2 (20,0)		6 (17,6)	16 (15,4)		2 (100,0)	2 (14,3)	
HDL colesterol												
<40 ♀ e 50 ♂ (n=42)	26 (61,9)	46 (54,8)	0,567	2 (50,0)	10 (100,0)	0,066	20 (62,5)	52 (55,3)	0,539	2 (100,0)	10 (83,3)	1,000
≥40 ♀ e 50 ♂ (n=28)	16 (38,1)	38 (45,2)		2 (50,0)	0 (0,0)		12 (37,5)	42 (44,7)		0 (0,0)	2 (16,7)	
LDL colesterol												
< 100 mg/dL (n=33)	12 (35,3)	46 (65,7)	0,006	2 (100,0)	6 (60,0)	0,515	14 (53,8)	44 (56,4)	0,824	0 (0,0)	8 (80,0)	0,091
≥ 100 mg/dL (n=25)	22 (64,7)	24 (34,3)		0 (0,0)	4 (40,0)		12 (46,2)	34 (43,6)		2 (100,0)	2 (20,0)	
Triglicérides												
<150 mg/dL (n=61)	36 (75,0)	76 (84,4)	0,253	2 (33,3)	8 (80,0)	0,118	30 (88,2)	82 (78,8)	0,314	0 (0,0)	10 (71,4)	0,125
≥ 150 mg/dL (n=16)	12 (25,0)	14 (15,6)		4 (66,7)	2 (20,0)		4 (17,8)	22 (21,2)		2 (100,0)	4 (28,6)	

Teste exato de Fisher e teste do qui-quadrado; n= frequências alélicas; ^{a,b}estatisticamente significativo (p<0,05).

APOE= Apolipoproteína E; MELD= modelo para doença hepática terminal; IMC= índice de massa corporal; CHC= carcinoma hepatocelular; AFP= alfa-fetoproteína; METAVIR F4= cirrose; METAVIR A1= grau mínimo de inflamação; METAVIR A1A2= grau mínimo e moderado de inflamação; METAVIR A3= alto grau de inflamação; HDL= lipoproteínas de alta densidade; LDL= lipoproteína de baixa densidade; NA= não aplicável.

Em relação às análises de correlação de Spearman entre MELD e as variáveis independentes estudadas em todos os pacientes cirróticos ($n=179$), os escores de MELD se correlacionaram inversamente fraco com o IMC ($r=-0,344$; $p=0,021$) entre os portadores E2 positivos (**Figura 21A**). Além disso, entre os portadores não-E2, o MELD correlacionou-se significativo e positivamente fraco com os escores de APRI ($r=0,211$; $p=0,019$) e FIB4 ($r=0,184$; $p=0,042$) (**Figuras 21D e F**). Nos pacientes não portadores do alelo E4, o MELD foi inversamente correlacionado com o IMC ($r=-0,179$; $p=0,043$) (**Figura 21H**). No entanto, em portadores do alelo E4, o MELD correlacionou-se inversamente moderado com o HDL-colesterol ($r=0,498$; $p=0,049$) (**Figura 21I**).

Figura 21. Análises de correlação de Spearman (r) entre MELD e variáveis de pacientes cirróticos com ou sem alelos E2 e E4.



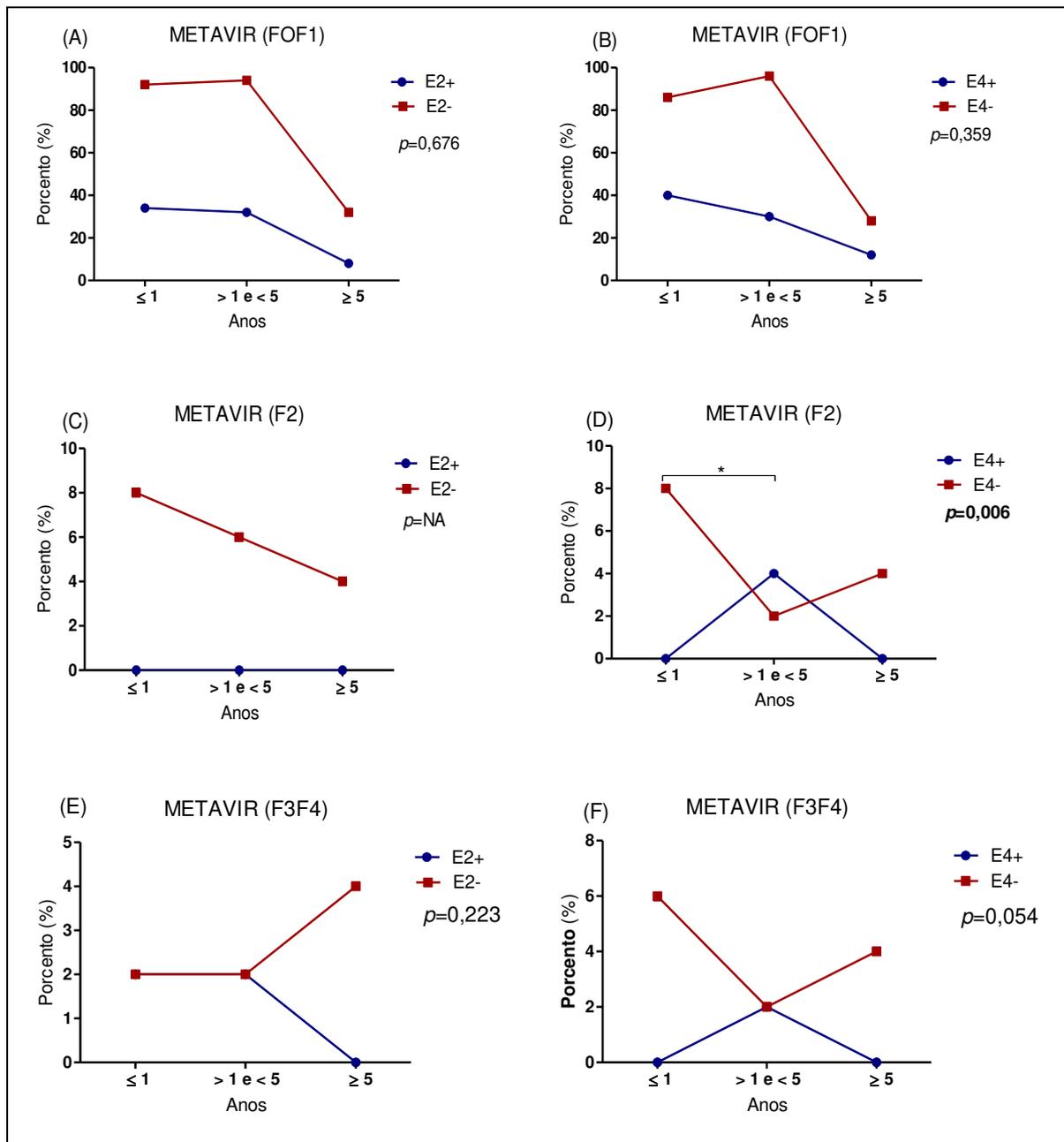
Spearman r ; **correlação moderada; *correlação leve.

MELD= modelo para doença hepática terminal; IMC= índice de massa corporal; APOE= Apolipoproteína E; APRI= índice AST/razão plaquetária; FIB4= fibrose 4; (E2- e E4-), ausência dos alelos; (E2+ e E4+), presença dos alelos.

4.1.2. Análise estatística de dados do pós-TOF

Quanto ao seguimento do grau de fibrose de biópsias do enxerto hepático de 91 pacientes no pós-TOF, na ausência do alelo E4, a frequência do grau de fibrose moderada (F2) foi superior na comparação em até 1 ano e entre 1 e 5 anos ($p=0,006$) (**Figura 22D**). Não houve diferença nas demais análises (**Figura 22**).

Figura 22. Seguimento de fibrose hepática no pós-TOF conforme os alelos E2 e E4.

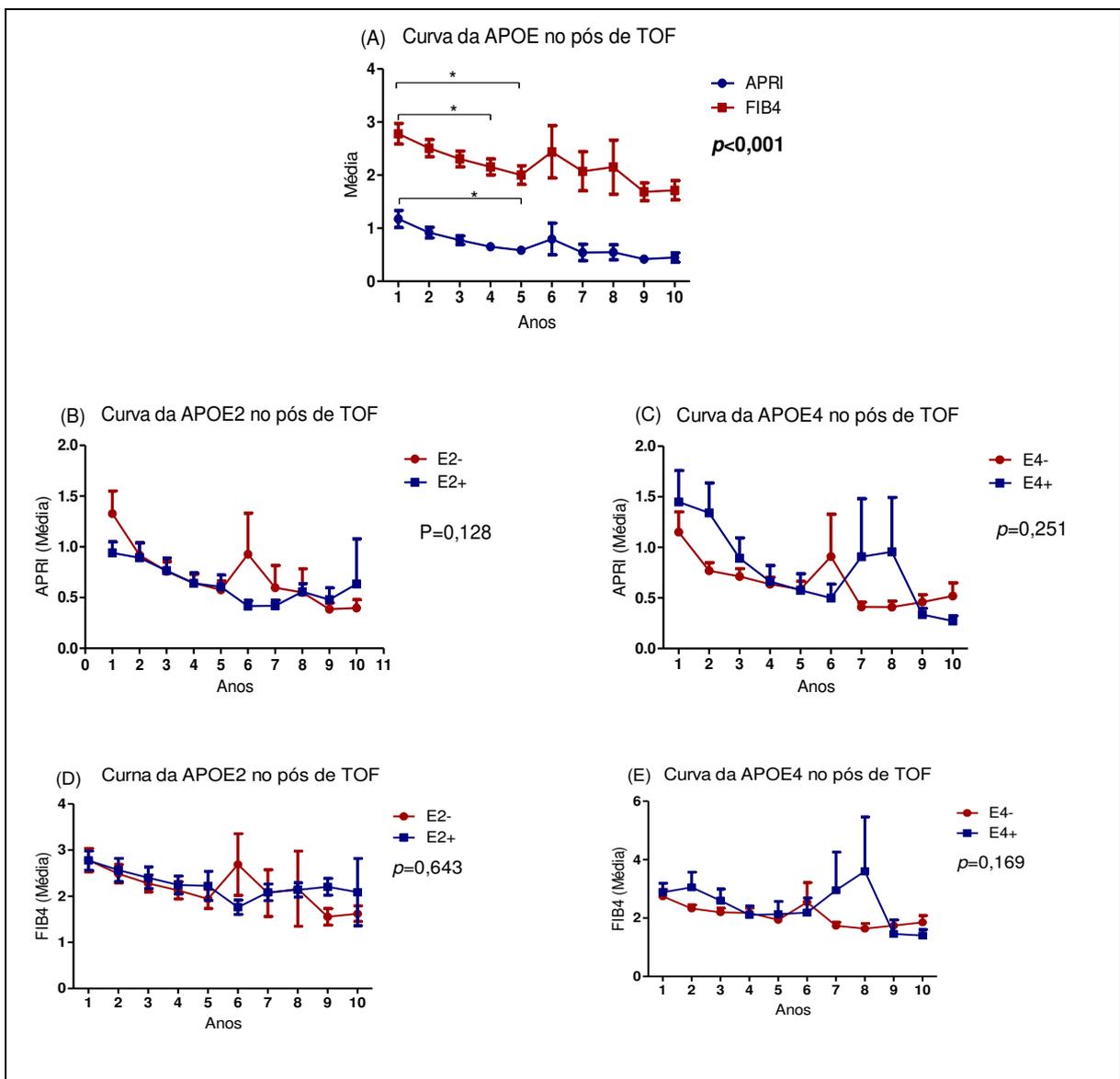


Análises realizadas pelo teste do qui-quadrado de Fisher.

F= grau de fibrose; NA= não aplicável; (E2- e E4-), ausência dos respectivos alelos; (E2+ e E4+), presença dos respectivos alelos.

Em seguimento de 10 anos após o TOF, com base em testes não invasivos (APRI e FIB4) da população total transplantada, foi encontrada uma redução significativa na média do escore APRI do primeiro ano quando comparado ao quarto e quinto anos ($p < 0,001$), bem como das médias do escore FIB4 entre o primeiro e quinto ano ($p < 0,001$) (**Figura 23A**). Os escores de APRI e FIB4 ao longo do tempo de acompanhamento não apresentaram significância, independentemente dos alelos E2 e E4 (**Figura 23**).

Figura 23. Seguimento por métodos não invasivos (APRI e FIB4) de pacientes no pós-TOF conforme os alelos E2 e E4.



Análises feitas por two-way ANOVA. * $p < 0,05$. Os resultados são mostrados em média \pm SEM. APOE= Apolipoproteína E; TOF= Transplante ortotópico de fígado; APRI= índice AST/razão plaquetária; FIB4= Fibrose 4; (E2- e E4-), ausência dos respectivos alelos; (E2+ e E4+), presença dos respectivos alelos.

5. DISCUSSÃO

Evidências apontam que os polimorfismos da APOE podem influenciar a progressão da doença hepática crônica (AHN *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2015; WOZNIAK *et al.*, 2002). Assim, esse estudo avalia o papel dos polimorfismos genéticos da APOE em pacientes com cirrose hepática induzida por HCV associada ou não a HCC, transplantado ou não, com carga viral positiva ou negativa, com foco na influência dos alelos E2 e E4 em uma população brasileira. Relacionamos os portadores E2 e E4 com o grau de inflamação hepática, fibrose e gravidade da doença pelos escores de Child-Pugh e MELD, usando biópsias hepáticas e/ou índices não invasivos, como APRI e FIB4, categorizados conforme o escore de METAVIR. Além disso, também associamos os alelos de APOE a comorbidades e níveis sanguíneos lipídicos.

A progressão da fibrose hepática em pacientes portadores de hepatite C crônica tem sido um processo comum. Um terço dos casos, evolui com cirrose hepática após um curso prolongado de alterações na bioquímica hepática (AFDHAL *et al.*, 2004). Pesquisadores têm identificado que o sexo masculino, consumo de álcool, idade avançada e resistência à insulina são preditores de progressão da fibrose, que explicam parte da variabilidade da doença. (FELD *et al.*, 2006; MASSARD *et al.*, 2006).

A fisiopatologia entre ApoE e hepatite C acontece através dos mecanismos adotados pelo HCV para disseminar na circulação sanguínea e entrar nos hepatócitos. Foi descrito que o HCV percorre a circulação sanguínea ligado às lipoproteínas e utiliza principalmente a via do receptor LDL para infectar as células do fígado (AGNELLO *et al.*, 1999). Conseqüentemente, estudos têm sugerido que o polimorfismo de ApoE pode prever diferentes resultados da infecção pelo HCV (FABRIS *et al.*, 2005; PRICE *et al.*, 2006; TONIUTTO *et al.*, 2004).

No presente estudo, incluímos pacientes no pré- e pós-TOF, o último grupo, principalmente os portadores não-E2, apresentaram uma porcentagem maior de pacientes previamente infectados pelo HCV com sorologia negativa após o tratamento com terapia antiviral. Autores têm levantado que indivíduos portadores do alelo E2 infectados com o HCV estão associados a um baixo risco de infecção e rápida eliminação (HISHIKI *et al.*, 2010). Em outro estudo que avaliou apenas pacientes com

infecção crônica persistente pelo HCV, foi encontrado maior risco de infecção persistente pelo HCV em pacientes portadores do alelo E3 (MUELLER *et al.*, 2016).

O genótipo 1 do HCV foi o mais prevalente (61,9%) na população geral, seguido pelo genótipo 3 (35,7%) e pelo genótipo 2 (2,4%). Esses achados concordam com dados anteriores de estudos brasileiros (FREITAS *et al.*, 2014; HOLZMANN *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2013) e no mundo (GOWER *et al.*, 2014; SMITH *et al.*, 2014).

AHN *et al.* (2012) encontraram similarmente ao nosso estudo, uma alta frequência de diferenciação histológica do HCC de moderadamente diferenciado, seguido pelo pouco diferenciado, em pacientes infectados pelo HCV residentes na Coreia do Sul. Em outro estudo multicêntrico incluindo diferentes etiologias da população brasileira, mas com 60% dos casos de HCC associado ao HCV, os pesquisadores também encontraram uma frequência superior da diferenciação histológica do HCC de moderadamente diferenciado, seguido pelo pouco diferenciado (CHAGAS *et al.*, 2019). Em outra análise, contrariando os nossos achados, a diferenciação histológica mais frequente foi a pouco diferenciada, seguido pela moderadamente diferenciada (COSTA *et al.*, 2014). Quanto a estratificação dos alelos da APOE, evidenciamos que em pacientes portadores do alelo E4, o tipo histológico pouco diferenciado (menos grave) foi mais comum.

Independente do alelo E2, identificamos que pacientes menos grave (Child-Pugh B), apresentaram menores níveis de AFP, mas sem relevância quando analisados em relação a estratificação dos alelos E2 e E4 com pacientes incluídos ou fora dos critérios de Milão.

No presente estudo, o E3 foi o alelo APOE mais comum em nossa população infectada pelo HCV (67,3%), um pouco abaixo dos 70-80% esperados observados na população brasileira em geral (FUZIKAWA *et al.*, 2007) e em outros países (FABRIS *et al.*, 2011; MUELLER *et al.*, 2016). Além disso, a frequência do alelo E2 foi de 17,1%, inesperadamente maior que a população geral brasileira (FUZIKAWA *et al.*, 2007) e ainda maior que o alelo E4 (15,6%). A frequência de E2 na população de nosso estudo também foi maior que a encontrada por Wozniak *et al.* (2002) (7,7%) em um estudo no Reino Unido. Em outros relatos, o HCV sintetizado em indivíduos portadores do alelo E2 está associado a um baixo risco de infecção e rápida eliminação

Todos os explantes e enxertos hepáticos foram biopsiados durante o TOF. Por outro lado, no pré-operatório, poucos pacientes foram submetidos a biópsia hepática devido ao alto risco de sangramento, uma vez que é comum a presença de distúrbio de coagulação nessa população. No pós-TOF, as biópsias hepáticas foram realizadas sob demanda daqueles pacientes que apresentavam carga viral positiva ou alto risco de recorrência viral, bem como com progressão da fibrose, rastreados por alguns biomarcadores de disfunção hepática como aumento dos níveis no sangue de bilirrubinas, transaminases ou glutamil transferases.

As biópsias hepáticas de 89 explantes hepáticos e de 2 pacientes no pré-TOF, mostraram que os pacientes cirróticos portadores do alelo E4 eram menos propensos a apresentar inflamação grave. Esses resultados também foram evidenciados naqueles pacientes cirróticos com doença hepática menos grave (MELD \leq 25) em portadores do alelo E4. É importante ressaltar que todos esses pacientes com inflamação hepática grave foram tratados com terapia antiviral apenas no pós-TOF. Concordando com nossos resultados, outros autores identificaram um papel protetor da APOE4 contra lesão hepática grave relacionada ao HCV, na comparação daqueles com doença hepática leve (WOZNIAK *et al.*, 2002). No entanto, ao contrário desses achados, MUELLER *et al.* (2003) não conseguiram associar o alelo E4 à proteção contra fibrose hepática em pacientes com cirrose hepática crônica infectados pelo HCV. No estudo de PRICE *et al.* (2006), uma frequência significativamente menor dos alelos E2 e E4 foi associada a um risco reduzido de infecção em pacientes com HCV.

Outros autores também encontraram maior frequência do alelo E4 entre pacientes não cirróticos crônicos com hepatite C, sugerindo que o alelo E4 é protetor contra a infecção pelo HCV (TEAMA *et al.*, 2016). Em outro estudo com 996 pacientes infectados cronicamente pelo HCV, o alelo APOE4 foi sub-representado (MUELLER *et al.*, 2016).

AHN *et al.* (2012) sugeriram que altos níveis de APOE em pacientes com cirrose hepática podem ser decorrentes de inflamação hepática. A APOE tem sido associado à modulação da função imune, uma vez que a APOE pode afetar a proliferação de linfócitos CD4 e CD8, reduzindo a produção de IL-2 derivada de linfócitos, uma citocina chave na regulação da diferenciação linfocitária (KELLY *et al.*, 1994). Especulamos que a redução nos níveis plasmáticos de APOE, que é

reconhecida nos portadores de APOE4 (MAHLEY *et al.*, 2016), possa ser protetora para apoiar o TOF e reduzir o excesso de inflamação e fibrose decorrente da infecção crônica pelo HCV.

Encontramos, que pacientes portadores do alelo E2, menos graves (Child-Pugh A e MELD \leq 25), apresentaram níveis séricos mais altos de LDL colesterol com risco aumentado para hipercolesterolemia. Em pacientes portadores do alelo E4, menos grave (Child-Pugh A), apresentaram baixo risco para hipertrigliceridemia. Já aqueles pacientes portadores do alelo E4, porém mais grave (MELD $>$ 25), apresentaram um risco aumentado para hipercolesterolemia com níveis de colesterol total mais altos. Contrariamente aos nossos achados EICHNER *et al.* (2002) identificaram uma combinação comum de hipocolesterolemia e hipertrigliceridemia em portadores do genótipo APOE2. Também, mostraram que o alelo E4 pode diminuir o HDL colesterol e aumentar os níveis plasmático de triglicérides (EICHNER *et al.*, 2002). Em outras análises, foi evidenciado diminuição dos níveis de colesterol total e das lipoproteínas com a progressão da fibrose e o início da cirrose (JIANG *et al.*, 2010) e que além disso, hipotrigliceridemia e hipocolesterolemia estão significativamente correlacionadas com os critérios prognósticos de Child-Pugh e MELD (JANICKO *et al.*, 2013).

HABIB *et al.* (2005) investigaram 413 pacientes com cirrose de diferentes causas e identificaram que a necessidade de transplante de fígado por até 1 ano foi elevada naqueles com níveis de HDL $<$ 30 mg/dL. Os autores também identificaram uma correlação significativa entre o nível de HDL e o escore de MELD.

Na nossa investigação, a obesidade foi mais comum em pacientes portadores do alelo E4 e com doença hepática mais grave (Child-Pugh C e MELD $>$ 25). Similarmente, estudos prévios mostraram que a obesidade é frequente em indivíduos portadores do alelo E4 (LONG *et al.*, 2003). Além disso, a obesidade pode ser um fator de risco para lesão hepática induzida pelo HCV.

O MELD é um escore preditivo de mortalidade de pacientes cirróticos na lista de espera para transplante e é considerado um preditor independente de morbimortalidade para pacientes cirróticos (OBERKOFER *et al.*, 2010). Em nossa análise, o MELD se correlacionou negativamente fraco com o IMC em portadores E2

e em pacientes não E4. Testes não invasivos (APRI e FIB4) mostraram uma correlação positiva fraca com MELD em portadores não-E2. Também, em pacientes portadores do alelo E4, a média (27,0) do escore MELD correlacionou-se inversamente moderado com a média (38,7 mg/dL) do HDL-colesterol. Esses achados sugerem que o nível de HDL abaixo do normal não está associado à gravidade da doença em pacientes com o alelo E4, talvez porque o alelo E4 seja protetor contra a gravidade da cirrose.

No seguimento de 144 pacientes transplantados hepático, identificamos uma proteção do alelo E4 contra a progressão de fibrose hepática em 91 (63,2%) desses pacientes, que foram submetidos a biópsia hepática no pós-TOF. WOZNIAK *et al.* (2002) também encontraram um papel protetor da APOE4 contra fibrose hepática severa relacionada ao HCV, na comparação daqueles com doença hepática leve. Outras investigações também relataram um benefício do alelo E4 na progressão da fibrose em pacientes transplantados hepáticos com diagnóstico de recorrência do HCV. Além disso, os polimorfismos da APOE também podem modular a recorrência do HCV nessa população, afetando o metabolismo das lipoproteínas (FABRIS *et al.*, 2005). Outros dados reportam que a presença de pelo menos 1 alelo E4 pode estar associado a um resultado histológico superiormente melhor em receptores de TOF, que evoluíram com recorrência de infecção pelo HCV (TONIUTTO *et al.*, 2004).

Em modelos experimentais, a ApoE sérica é um marcador sensível para monitorar o funcionamento e a sobrevida dos enxertos de hepatócitos transplantados. Esses resultados são importantes, pois o transplante de hepatócitos pode ser uma técnica promissora para pacientes com doença hepática metabólica ou insuficiência hepática aguda (JORNS *et al.*, 2013). Os polimorfismos de ApoE podem ser uma ferramenta importante para monitorar a progressão da fibrose em pacientes com hepatite C e valores normais de alanina aminotransferase, pois pode haver mecanismos de competição para entrada e replicação viral nas células (FABRIS *et al.*, 2011).

ApoE é um componente de vários tipos de lipoproteínas e está associada com o transporte de lipídios. Efeitos específicos das isoformas da ApoE têm sido identificados em relação a entrada de lipoproteínas para o interior das células, e esse mecanismo é o que poderia justificar os nossos resultados, corroborando com

investigações prévias, em que os autores têm sugerido que a APOE4 atua como um fator protetor contra a infecção pelo HCV. Esse mecanismo acontece, a partir do momento em que a presença da ApoE4 contribui para o aumento dos níveis séricos de LDL (WOZNIAK *et al.*, 2016; WELLER *et al.*, 2017). Logo, como essa lipoproteína entra nas células via LDL receptor, que é uma molécula que também pode ser um mediador de entrada para o HCV, o maior número de ligantes LDL receptor no plasma de portadores da ApoE4 aumentaria a competição pelo receptor, o que poderia impedir ou reduzir a ligação do vírus aos hepatócitos, diminuindo assim os danos a célula (ANDRÉ *et al.*, 2002; FELMLEE DJ *et al.*, 2013; POPESCU *et al.*, 2009; TUDORACHE *et al.*, 2017).

Além desse estudo, prévios estudos avaliando a estratificação dos alelos da APOE em outras etiologias, já têm sido documentados por pesquisadores brasileiros. Na população ribeirinha da Amazônia, os autores encontraram uma elevada proporção de participantes portadores do alelo E4 com taxa de glicose sanguínea em jejum acima de 100 mg/dL e hipertensão arterial sistêmica (ARRIFANO *et al.* 2018a). Em outro estudo, em populações ribeirinhas da Amazônia expostas cronicamente ao mercúrio, os dados sugerem que a APOE4 pode influenciar farmacocineticamente na exposição ao mercúrio, levando a um maior acúmulo e a piores consequências deletérias (ARRIFANO *et al.*, 2018b). ORIA *et al.* (2005) em um estudo no nordeste do Brasil, sugeriram um papel protetor do alelo APOE4 em crianças com histórico de intensos episódicos diarreicos nos primeiros 2 anos de vida. Em um estudo com população idosa de Fernando de Noronha-PE, os autores não identificaram relevância significativa na associação do alelo E4 com déficit cognitivo (GARCIA *et al.*, 2008).

No seguimento da fibrose hepática entre um e dez anos do TOF da população total transplantada, o escore médio de testes não invasivos (APRI e FIB4) tendeu a diminuir significativamente ao longo dos anos, apontando para a sobrevivência do enxerto hepático sem progressão da fibrose. Apoiando esses achados, embora a biópsia hepática seja o teste padrão-ouro para analisar o grau de fibrose, mas como apresenta algumas desvantagens, incluindo o risco de complicações graves como hemorragia. Esses métodos não invasivos têm sido amplamente utilizados na prática clínica para determinar o grau de fibrose (SEEFF *et al.*, 2010).

No entanto, estudos prévios já documentaram a importância e a validação do APRI na predição de fibrose e cirrose em pacientes com infecção crônica pelo HCV (HALFON *et al.*, 2007; MCGOOGAN KE *et al.*, 2010). Também foi demonstrado em crianças que o APRI foi moderadamente satisfatório na previsão de fibrose significativa com AUC de 0,71 (MCGOOGAN KE *et al.*, 2010). Além disso, em outro estudo em crianças com hepatite B, um AUC de 0,74 APRI previu fibrose hepática avançada (LEBENSZTEJN *et al.*, 2005). KARIC *et al.* (2018), mostraram que o FIB4 foi superior ao APRI na identificação de pacientes com fibrose severa ou cirrose na hepatite C crônica (FIB-4, AUC de 0,87 versus APRI, AUC de 0,86).

Esse estudo tem algumas limitações importantes, como: os dados de pacientes transplantados de fígado foram obtidos retrospectivamente em prontuários; não foram incluídos dados de doadores de enxerto de fígado; o tamanho da amostra pode não ter sido suficiente para tirar fortes conclusões e a recorrência do vírus da hepatite C não foi investigada. Embora investigações adicionais com um tamanho de amostra maior, incluindo dados de doadores e recorrência de infecção viral, sejam muito necessárias, este trabalho pode orientar futuros estudos clínicos para investigar melhor os efeitos protetores do APOE4 na necroinflamação do fígado e na progressão da fibrose tanto no pré quanto no pós de TOF. Ressaltamos também, que a cirrose hepática por vírus C é multifatorial existindo outros genes além da APOE.

No entanto, nossos achados mostraram que a APOE4 e o FIB4 podem ser importantes ferramentas na conduta médica de pacientes no seguimento de inflamação e fibrose hepática, pois o APOE4 foi protetor contra a progressão da inflamação e fibrose hepática, lembrando que os pacientes com grau de inflamação severa e grau moderado de fibrose (F2) foram curados para o HCV apenas no período pós-TOF e o FIB4 foi mais sensível em avaliar o grau de fibrose hepática nessa população.

6. CONCLUSÃO

- Embora com limitações numéricas, nossos achados apoiam ainda mais a proteção do APOE4 contra cirrose hepática induzida por HCV em uma população brasileira com fibrose e inflamação hepática relacionadas, principalmente naqueles com MELD \leq 25 (menos grave).
- O APOE2 foi super-representado nessa amostra de HCV, sugerindo que os portadores de E2 apresentam risco aumentado e piores resultados após o HCV.
- O APOE4 se associou com o tipo histológico menos grave do carcinoma hepatocelular (pouco diferenciado) e com obesidade.
- Os níveis de AFP e tamanho do tumor (dentro ou fora dos critérios de Milão), não diferenciaram quanto aos alelos da APOE.
- Os preditores de gravidade como o MELD e Child-Pugh não diferenciaram quanto aos alelos da APOE.
- A maioria dos pacientes foi curada do HCV com drogas antivirais de ação direta.

Em resumo, os principais achados desse estudo incluem:

1. Uma maior porcentagem de pacientes foi curada para o HCV (sorologia negativa), após o tratamento com terapia antiviral. Entre esses portadores não-APOE2, a presença de pacientes com sorologia positiva para o HCV foi menos encontrada.
2. A infecção pelo genótipo 1 do HCV foi mais prevalente (61,9%), seguida pelo genótipo 3 (35,7%) e pelo genótipo 2 (2,4%) na população geral. Os portadores de APOE2 e APOE4 também apresentaram alta frequência do genótipo 1 do HCV.
3. Quanta à diferenciação histológica de biópsias do HCC, o tipo moderadamente diferenciado foi mais frequente (58,9%), seguido pelo pouco diferenciado (34,2%). Em pacientes não-APOE4, a frequência do HCC do tipo pouco diferenciado foi significativamente maior quando comparado ao bem diferenciado.
4. A frequência dos alelos E3 e E4 da APOE foi de (67,3%) e (15,6%), respectivamente. A frequência do alelo E2 foi surpreendentemente alta (17,1%). O genótipo mais frequente na população total foi E3/E3 (92 de 179) (51,4%).
5. A maior frequência de pacientes portadores do alelo E2 com um grau mínimo de inflamação (A1) foram tratados com antivirais no pré-TOF. Em portadores não-E4 com um grau mínimo de inflamação (A1), o tratamento do HCV com antivirais foi maior no pré-TOF. Em pacientes não-E2 com um grau mínimo e moderado de inflamação (A1A2), o tratamento do HCV com antivirais foi maior no pós-TOF. Além disso, todos os pacientes com inflamação hepática avançada (A3) foram tratados com antivirais no pós-TOF.
6. Os pacientes que evoluíram para fibrose moderada (METAVIR F2), no seguimento pós-TOF, foram tratados com terapia antiviral somente no período pós-TOF.
7. Na análise de biópsias de 89 explantes hepáticos e de 2 pacientes com cirrose hepática aguardando na fila de TOF, o grau de inflamação severa categorizado pelo escore de METAVIR e METAVIR extremo, foi significativamente menos frequente nos pacientes portadores do alelo APOE4 e principalmente naqueles com doença hepática menos grave (MELD \leq 25).

8. Em pacientes portadores do alelo E4 e com escores de Child-Pugh C (alta gravidade), a frequência de pacientes obesos foi superior.
9. Em portadores do alelo E4, o MELD correlacionou-se inversamente moderado com o HDL-colesterol.
10. Quanto ao seguimento do grau de fibrose de biópsias do enxerto hepático de 91 pacientes no pós-TOF, na ausência do alelo E4, a frequência do grau de fibrose moderada (F2) foi superior na comparação em até 1 ano e entre 1 e 5 anos.
11. Em seguimento de 10 anos após o TOF, com base em testes não invasivos (APRI e FIB4) da população total transplantada, foi encontrada uma redução significativa na média do escore APRI do primeiro ano quando comparado ao quarto e quinto anos, bem como das médias do escore FIB4 entre o primeiro e quinto ano.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASLD-IDS A HCV Guidance Panel. Hepatitis C Guidance 2018 Update: AASLD-IDS A Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C Virus Infection. **Clin Infect Dis** 2018; 67(10): 1477-1492.

AFDHAL NH. The natural history of hepatitis C. *Semin. Liver Dis* 2004; 24 (Supl. 2): 3-8.

AGNELLO V et al. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(22): 12766-12771.

AHN SJ et al. Association between apolipoprotein E genotype, chronic liver disease, and hepatitis B virus. **Clin Mol Hepatol** 2012;18: 295-301.

ANDRADE F et al. Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. **Bras J Med and Biol Research** 200; 33(5): 529-537.

ANDRÉ P et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. **J Virol.** 2002; 76: 6919-28.

ARRIFANO GPF et al. In the Heart of the Amazon: Noncommunicable Diseases and Apolipoprotein E4 Genotype in the Riverine Population. **Int J Environ Res Public Health** 2018a; 15(9): 1957.

ARRIFANO GPF et al. Genetic Susceptibility to Neurodegeneration in Amazon: Apolipoprotein E Genotyping in Vulnerable Populations Exposed to Mercury. **Front Genet** 2018b; 9: 285.

BARBOSA FC et al. Cuidados pré-operatórios em hepatopatas. **Rev Assoc Med Bras** 2010; 56(2): 222-6.

BEDOSSA P et al. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. **Hepatology** 1994; 20:15-20.

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.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - Hepatites Virais - Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde – **Brasil** 2018; 49 (31).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Portaria GM n1160 de 29 de maio de 2006. Diário Oficial da União n103, Brasília, 31 de maio de 2006. Brasil: Secretaria de Assistência à Saúde. **Ministério da Saúde** 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Prevenção e Controle das IST do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico Hepatites Virais** 2017.

BRUIX J, Llovet JM. Major achievements in hepatocellular carcinoma. **Lancet** 2009; 373(9664): 614-6.

BRUIX J, Sherman M. American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update. **Hepatology** 2011; 53(3): 1020-2.

CALERO O et al. Apolipoprotein E genotyping method by real time PCR, a fast and cost-effective alternative to the TaqMan and FRET assays. **J Neurosci Methods** 2009; 183: 238-40.

CARMEN V et al. Recurrence of hepatitis C after liver transplantation. **Ann Gastroenterol** 2013; 26(4): 304-313.

CARRILHO FJ et al. Brazilian society of hepatology recommendations for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. **Arq Gastroenterol** 2015; 52 Suppl 1: 2-14.

CENTER FOR DISEASE ANALYSIS. Strategies to Manage the Future HCV Disease Burden in Brazil. 2017.

CHAGAS AL et al. Brazilian HCC Study Group. Hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation in a Brazilian multicenter study: clinical profile and prognostic factors of survival. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 2019; 31(9): 1148-1156.

CHEN YC et al. Apolipoprotein E is required for cell proliferation and survival in ovarian cancer. **Cancer Res** 2005; 65: 331-337.

CHEVALIEZ S. Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. **Clinical Microbiology and Infection** 2011; 17(2): 116-121.

CHOLONGITAS E et al. A systematic review of the performance of the model for end-stage liver disease (MELD) in the setting of liver transplantation. **Liver Transpl** 2006; 12: 1049-61.

CLAVIEN PA et al. Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. **Lancet Oncol** 2012; 13: e11-22.

COELHO GR et al. Outcomes of Liver Transplant Recipients With Model for End-Stage Liver Disease Exception: Single-Center Experience in the Northeast of Brazil. **Transplant Proc** 2018; 50(5): 1428-1430.

COLLI A et al. Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review. **Am J Gastroenterol** 2006; 101: 513-23.

CONITEC. Ministério da Saúde. Inibidores de protease (boceprevir e telaprevir) para o tratamento da hepatite crônica C. **Relatório de recomendações, Brasília, Brasil.** 2012.

CONITEC. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções. **Relatório de recomendações, Brasília, Brasil**. 2015.

CONITEC. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções. **Relatório de recomendações, Brasília, Brasil**. 2018.

COSTA PE et al. Ten-year experience with liver transplantation for hepatocellular carcinoma in a Federal University Hospital in the Northeast of Brazil. **Transplant Proc** 2014; 46(6): 1794-1798.

CRAWFORD JM 2000. O fígado e o trato biliar, p.759-808. In: Cotran R.S., KumanV. & Collins T. (ed.), Robbins' Patologia Estrutural e Funcional. 6^a ed. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro. 1250p.

DE LOPE CR et al. Management of HCC. **J Hepatol** 2012; 56 Suppl 1: S75-87.

DRISCOLL DM, Getz GS. Extrahepatic synthesis of apolipoprotein E. **J Lipid Res** 1984; 25: 1368-1379.

DUFFY JP et al. Liver transplantation criteria for hepatocellular carcinoma should be expanded: a 22-year experience with 467 patients at UCLA. **Ann Surg**. 246(3): 502-509, 2007.

EASL-EORTC. European Association For The Study Of The Liver; European Organisation For Research And Treatment Of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. **J Hepatol** 2012; 56(4): 908-43.

EASL. European Association for the Study of the Liver. Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. **Journal of Hepatology** 2015; 63: 199-236.

EASL. European Association for the Study of the Liver. Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. **J Hepatol** 2018; 69(2) :461-511.

EICHNER JE et al. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: aHuGE review. **Am J Epidemiol** 2002;155: 487-495.

EL-SERAG HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. **N Engl J Med** 1999; 340: 745-750.

FABRIS C et al. Low fibrosis progression of recurrent hepatitis C in apolipoprotein E epsilon4 carriers: relationship with the blood lipid profile. **Liver Int** 2005; 25: 1128-436.

FABRIS C et al. Apolipoprotein E genotypes modulate fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and persistently normal transaminases. **J Gastroenterol Hepatol** 2011; 26: 328-333.

FARNSWORTH N et al. Child-Turcotte-Pugh versus MELD score as a predictor of outcome after elective and emergent surgery in cirrhotic patients. **Am J Surg** 2004; 188: 580-3.

FAUTEUX-DANIEL S et al. "Vertical Transmission of Hepatitis C Virus: Variable Transmission Bottleneck and Evidence of Midgestation In Utero Infection. **Journal of Virology** 2017; 91(23).

FELD JJ, Liang TJ. Hepatitis C-identifying patients with progressive liver injury. **Hepatology** 2006; 43: S194-206.

FELMLEE DJ et al. Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins--impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. **Viruses** 2013; 5: 1292-324.

FRANCOZ C, Durand F. The risk of surgery in patients with cirrhosis. **Acta Gastroenterol Belg** 2008; 71:42-6.

FREITAS SZ et al. Coinfecção HIV e HCV: Prevalência, fatores associados e caracterização dos genótipos na Região Centro-Oeste do Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 2014; 56(6): 517-524.

FREITAS ACT et al. Estudo comparativo em pacientes cirróticos portadores e não portadores de carcinoma hepatocelular submetidos ao transplante hepático: análise do MELD, do tempo em lista de espera e da sobrevida. **ABCD Arq Bras Cir Dig** 2016; 29(1): 21-25.

FRULIO N, Trillaud H. Ultrasound elastography in liver. **Diagn Interv Imaging** 2013; 94(5): 515-534.

FORNER A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet** 2012; 379(9822):1245-55.

FUZIKAWA AK et al. Apolipoprotein E polymorphism distribution in an elderly Brazilian population: the Bambui Health and Aging Study. **Braz J Med Biol Res** 2007; 40: 1429-1434.

GARCIA AN et al. APOE-epsilon4 polymorphism and cognitive deficit among the elderly population of Fernando de Noronha. **Arq Neuropsiquiatr** 2008; 66(2B): 298-302.

GARCIA JHP. Implantação do Transplante Ortotópico de Fígado Humano no Estado do Ceará. 2002. 100f. Tese (Doutor em Curso da Pós-Graduação em Farmacologia) – **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2002.

GARCIA-TSAO G et al. Portal hypertensive bleeding in cirrhosis: Risk stratification, diagnosis, and management: 2016 practice guidance by the American Association for the study of liver diseases. **Hepatology** 2017; 65(1):310-335.

GERDES LU et al. Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. **Genetic Epidemiology** 1992; 9: 155-167.

GERDES LU et al. The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective. **Human Genetics** 1996; 98: 546-550.

GETZ GS, REARDON CA. Apoprotein E and Reverse Cholesterol Transport. **Int JMol Sci** 2018; 19. pii: E3479.

GIANNINI EG et al. Alpha-fetoprotein has no prognostic role in small hepatocellular carcinoma identified during surveillance in compensated cirrhosis. **Hepatology** 2012; 56(4): 1371-9.

GIANNINI EG, Erroi V, Trevisani F. Effectiveness of α -fetoprotein for hepatocellular carcinoma surveillance: the return of the living-dead? **Expert Rev Gastroenterol Hepatol** 2012; 6(4): 441-4.

GÖKCAN H et al. The predictive value of noninvasive serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. **Turk Journal Gastroenterology** 2016; 27:156-64.

GOWER E et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **J Hepatol**. 2014; 61: S45-57.

GUPTA E, Bajpai M, Choudhary A. Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. **Asian Journal of Transfusion Science** 2014; 8(1): 19.

HISHIKI T et al. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. **J Virol** 2010; 84: 12048-12057.

HABIB A et al. High-density lipoprotein cholesterol as an indicator of liver function and prognosis in noncholestatic cirrhotics. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2005; 3: 286-291.

HAJARIZADEH B, Grebely J, Dore GJ. Case definitions for acute hepatitis C virus infection: a systematic review. **Journal of hepatology** 2012; 57(6): 1349-1360.

HALFON P et al. Comparison of test performance profile for blood tests of liver fibrosis in chronic hepatitis C. **J Hepatol** 2007; 46: 395-402.

HALLMAN DM et al. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. **American Journal of Human Genetics** 1991; 49: 338-349.

HOLZMANN I et al. Effectiveness of chronic hepatitis C treatment with direct-acting antivirals in the Public Health System in Brazil. **Braz J Infect Dis** 2018; 22(4): 317-322.

HUEBBE P, Rimbach G. Evolution of human apolipoprotein E (APOE) isoforms: Gene structure, protein function and interaction with dietary factors. **Ageing Research Reviews** 2017; 37: 146-161.

HUEGING K et al. Apolipoprotein E codetermines tissue tropism of hepatitis C virus and is crucial for viral cell-to-cell transmission by contributing to a postenvelopment step of assembly. **J Virol** 2014; 88: 1433-1446.

HUEGING K et al. Several Human Liver Cell Expressed Apolipoproteins Complement HCV Virus Production with Varying Efficacy Conferring Differential Specific Infectivity to Released Viruses. **PLoS One** 2015; 10(7): e0134529.

<https://www.vascularitajuba.com.br/cirurgia-endovascular/intervencao-no-transplante-hepatico>.

ISHAK K et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. **J Hepatol** 1995; 22: 696-699.

JANICKO M et al. Serum cholesterol is a significant and independent mortality predictor in liver cirrhosis patients. **Ann Hepatol** 2013;12: 581-587.

JIANG M et al. Combined MELD and blood lipid level in evaluating the prognosis of decompensated cirrhosis. **World J Gastroenterol** 2010; 16: 1397-1401.

JORNS C et al. Serum apolipoprotein E as a marker to monitor graft function after hepatocyte transplantation in a clinically relevant mouse model. **Transplant Proc** 2013; 45(5): 1780-6.

KAMATH PS et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. **Hepatology** 2001; 33: 464-70.

KARIC U et al. FIB-4 and APRI scores for predicting severe fibrosis in chronic hepatitis C - a developing country's perspective in DAA era. **J Infect Dev Ctries** 2018; 12: 178-182.

KELLY ME et al. Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. **Cell Immunol** 1994; 159: 124-139.

KOYAMA Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. **J Clin Invest** 2017; 127: 55-64.

KOOPAL C et al. Autosomal dominant familial dysbetalipoproteinemia: A pathophysiological framework and practical approach to diagnosis and therapy. **J Clin Lipidol** 2017; 11: 12-23.

KRAFT HG et al. Changes of genetic apolipoprotein phenotypes caused by liver transplantation. Implications for apolipoprotein synthesis. **J Clin Invest.** 1989; 83: 137-142.

KREKULOVÁ L, Reháč V, Riley LW. Structure and functions of hepatitis C virus proteins: 15 years after. **Folia Microbiol** 2006; 51(6) :665-80.

LEBENSZTEJN DM et al. A simple noninvasive index (APRI) predicts advanced liver fibrosis in children with chronic hepatitis B. **Hepatology** 2005; 41:1434-5.

LEE SG et al. Expanded indication criteria of living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma at one large-volume center. **Liver Transpl** 2008; 14(7): 935-945.

LIN J et al. A universal telomerase RNA core structure includes structured motifs required for binding the telomerase reverse transcriptase protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004; 101(41): 14713-8.

LINTON MF et al. Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation. **J Clin Invest** 1991; 88: 270-281.

LIU DY et al. Expression of telomerase activity and oxidative stress in human hepatocellular carcinoma with cirrhosis. **World J Gastroenterol**. 2003; 9: 1859-1862.

LLOVET JM, Fuster J, Bruix J. The Barcelona approach: diagnosis, staging, and treatment of hepatocellular carcinoma. **Liver Transpl** 2004; 10(2 Suppl 1): S115-20.

LONDON SJ et al. Collection of buccal cell DNA in seventh-grade children using water and a toothbrush. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2001; 10(11): 1227-30.

LONG JR et al. APOE and TGF-beta1 genes are associated with obesity phenotypes. **J Med Genet** 2003; 40: 918-24.

MAHLEY RW, Huang Y, Rall SC Jr. Pathogenesis of type III 393 hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. **J Lipid Res** 1999; 40: 1933-1949.

MAHLEY RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 2000; 1: 507-537.

MAHLEY RW. Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. **J Mol Med (Berl)** 2016; 94: 739-746.

MALINCHOC M et al. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. **Hepatology** 2000; 31: 864-871.

MANCUSO A, Perricone G. Hepatocellular Carcinoma and Liver Transplantation: State of the Art. **J Clin Transl Hepatol** 2014; 2(3): 176-81.

MANSOUR A et al. Abdominal operations in patients with cirrhosis: still a major surgical challenge. **Surgery** 1997; 122: 730-735.

MARRERO JA et al. Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology** 2018; 68(2): 723-750.

MARTIN AP et al. Overview of the MELD score and the UNOS adult liver allocation system. **Transplant Proc** 2007; 39: 3169-3174.

MASSARD J et al. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis. **C. J. Hepatol** 2006; 44: S19-24.

MAZZAFERRO V et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. **N Engl J Med** 1996; 334(11): 693-9.

MAZZAFERRO V, Schiavo M. Outcome of liver transplantation for HCC beyond conventional criteria: preliminary report on the "Metroticket survey". **Liver Transpl** 2007;13(6): Abst 195.

MCGOOGAN KE et al. Performance of the AST-to-platelet ratio index as a noninvasive marker of fibrosis in pediatric patients with chronic viral hepatitis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr** 2010; 50(3): 344-6.

MEKALA S et al. Cellular crosstalk mediated by platelet-derived growth factor BB and transforming growth factor β during hepatic injury activates hepatic stellate cells. **Can J Physiol Pharmacol** 2018; 96: 728-741.

MESSINA JP et al. 2015. "Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes." **Hepatology** 2015; 61(1): 77-87.

MONAZAHIAN M et al. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. **J Med Virol** 1999; 57: 223-229.

MUELLER T et al. Apolipoprotein E4 allele is associated with poor treatment response in hepatitis C virus (HCV) genotype 1. **Hepatology** 2003; 38: 1592-1593.

MUELLER T et al. Apolipoprotein E allele frequencies in chronic and self-limited hepatitis C suggest a protective effect of APOE4 in the course of hepatitis C virus infection. **Liver Int** 2016; 36: 1267-1274.

NASCIMENTO JCR et al. Impact of apolipoprotein E genetic polymorphisms on liver disease: An essential review. **Annals of Hepatology** 2020; 19: 24-30.

OBERKOFER CE et al. Model of end stage liver disease (MELD) score greater than 23 predicts length of stay in the ICU but not mortality in liver transplant recipients. **Crit Care**. 2010; 14: R117.

OLGA O, Nikolai D. Invasive and non-invasive monitoring of hepatitis C virus induced liver fibrosis: alternatives or complements? **Curr Pharm Biotechnol** 2003; 4, 195-209.

ORÍÁ RB et al. APOE4 protects the cognitive development in children with heavy diarrhea burdens in Northeast Brazil. **Pediatr Res** 2005; 57(2): 310-316.

ORÍÁ RB et al. Role of apolipoprotein E4 in protecting children against early childhood diarrhea outcomes and implications for later development. **Med Hypotheses** 2007; 68: 1099-1107.

QUE N et al. Gene expression profile of gastric carcinoma: identification of genes and tags potentially involved in invasion, metastasis, and carcinogenesis by serial analysis of gene expression. **Cancer Res** 2004;64: 2397-2405.

PANDEY CK et al. Intraoperative blood loss in orthotopic liver transplantation: The predictive factors. **World J Gastrointest Surg** 2015; 7(6): 86-93.

PARK YN. Update on precursor and early lesions of hepatocellular carcinomas. **Arch Pathol Lab Med** 2011;135(6):704-715.

PARKIN DM et al. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin**. 2005; 55: 74-108.

- PENG Y, Qi X, Guo X. Child-Pugh Versus MELD Score for the Assessment of Prognosis in Liver Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. **Medicine (Baltimore)** 2016; 95(8): e2877.
- PEREIRA LC et al. Apolipoprotein E, periodontal disease and the risk for atherosclerosis: a review. **Arch Oral Biol** 2019; 98: 204-212.
- PEREIRA LM et al. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. **BMC Infect Dis** 2013; 13: 60.
- PETKEVICIENE J et al. Associations between apolipoprotein E genotype, diet, body mass index, and serum lipids in Lithuanian adult population. **PLoS ONE** 2012; e41525.
- PFAENDER S et al. Assessment of cross-species transmission of hepatitis C virus-related non-primate hepacivirus in a population of humans at high risk of exposure. **Journal of General Virology** 2015; 96(9): 2636-2642.
- POLARIS OBSERVATORY HCV COLLABORATORS. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. **Lancet Gastroenterol Hepatol** 2017; 2(3): 161-176.
- POPESCU CI, Dubuisson J. Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. **Biol Cell** 2009; 102: 63-74.
- PRICE DA et al. Apolipoprotein epsilon3 allele is associated with persistent hepatitis C virus infection. **Gut** 2006;55: 715-718.
- RAIA S, Nery JR, Mies S. Liver transplantation from live donors. **Lancet** 1989; 2(8661): 497.
- RAMADORI G et al. Fat-storing (Ito) cells of rat liver synthesize and secrete apolipoproteins: comparison with hepatocytes. **Gastroenterology** 1989; 97: 163-72.
- RBT - Registro Brasileiro de Transplantes. Dimensionamento dos transplantes no Brasil e em cada estado. **ABTO** 2019; 4: 1-101.
- RIBEIRO JE, Oliveira RS, Hallal RC. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções. Ministério da Saúde. Série A. Normas e Manuais Técnicos, **Brasília** 2017.
- ROHLFS RV, Weir BS. Distributions of Hardy – Weinberg Equilibrium Test Statistics. **Genetics** 2008; 1616: 1609-1616.
- SALUDES V et al. Tools for the diagnosis of hepatitis C virus infection and hepatic fibrosis staging. **World J Gastroenterol** 2014; 20(13): 3431-42.
- SCHIERWAGEN R et al. Seven weeks of Western diet in apolipoprotein-E-deficient mice induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis. **Sci Rep** 2015; 5: 12931.

SCHMITZ F et al. Robust association of the APOE epsilon4 allele with premature myocardial infarction especially in patients without hypercholesterolaemia: the Aachen study. **Eur J Clin Invest** 2007; 37: 106-108.

SCHNEIDER WJ et al. Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits, and cows. **J Clin Invest** 1981; 68: 1075-85.

SEEFF LB et al. Complication rate of percutaneous liver biopsies among persons with advanced chronic liver disease in the HALT-C trial. **Clinical Gastroenterology and Hepatology** 2010; 8(10): 877-883.

SHAHEEN AA, Myers RP. Diagnostic accuracy of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review. **Hepatology** 2007; 46(3): 912-21.

SHEN Y et al. Association of apolipoprotein E with the progression of hepatitis B virus-related liver disease. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8: 14749-14756.

SILVA ISS. Cirrose hepática. **RBM** 2010; 67(4): 111-120.

SIMMONDS P et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **J Gen Virol** 2017; 98(1): 2-3.

SIRQUEIRA EN. Avaliação das taxas de resposta terapêutica de pacientes portadores de hepatite C submetidos a terapias com antivirais de ação direta de nova geração: revisão sistemática, 2017. 48f. Trabalho de conclusão de curso (Faculdade de Medicina da UFBA). **Universidade Federal da Bahia**. 2017. <http://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/21363>.

SMITH DB 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.

STACHOWSKA E et al. Apolipoprotein E4 allele is associated with substantial changes in the plasma lipids and hyaluronic acid content in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **J Physiol Pharmacol** 2013; 64: 711-717.

STARZL TE et al. Homotransplantation of the liver in humans. **SGO** 1963; 117: 659-76.

STARZL TE, Groth CG, Makowka L. Liver transplantation. **Clio Chirurgica**. 1988; 15: 163-284.

STARZL TE, Demetris AJ, Van Thiel D. Liver transplantation. **N Engl J Med**. 321: 1014-1022, 1989.

STERLING RK et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis patients with HIV/HCV co-infection. **Hepatology** 2006; 43:1317-1325.

TEAMA SHH et al. Apolipoprotein-E Gene Polymorphism and Possible role of ApoE e4 Allele with a Lower Probability of Progression to HCV-Related Liver Cirrhosis in

Egyptian Patients. **Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences** 2016;4: 440-447.

TELEM DA et al. Factors that predict outcome of abdominal operations in patients with advanced cirrhosis. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2010; 8: 451-47.

TERRAULT NA et al. International Liver Transplantation Society Consensus Statement on Hepatitis C Management in Liver Transplant Candidates. **Transplantation** 2017; 101(5): 945-55.

TINKLE CL, Haas-Kogan D. Hepatocellular carcinoma: natural history, current 511 management, and emerging tools. **Biologics** 2012; 6: 207-219.

TOSHIKUNI N et al. Hepatitis C-related liver cirrhosis - strategies for the prevention of hepatic decompensation, hepatocarcinogenesis, and mortality. **World J Gastroenterol** 2014; 20(11): 2876-2887.

TREVISANI F et al. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. **J Hepatol** 2001; 34(4): 570-5.

TSOCHATZIS EA et al. Elastography for the diagnosis of severity of fibrosis in chronic liver disease: a meta-analysis of diagnostic accuracy. **J Hepatol** 2011; 54: 650-659.

TSORIS A, Marlar CA. Use Of The Child Pugh Score In Liver Disease. In: Stat Pearls. Treasure Island (FL): **Stat Pearls Publishing**; 2020.

TSUCHIDA T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. **Ann Gastroenterol Surg** 2017; 1: 52-59.

TUDORACHE IF, Trusca VG, Gafencu AV. Apolipoprotein E – A Multifunctional Protein with Implications in Various Pathologies as a Result of Its Structural Features. **Comput Struct Biotechnol J** 2017; 15: 359-365.

TONIUTTO P et al. Carriage of the apolipoprotein E-epsilon4 allele and histologic outcome of recurrent hepatitis C after antiviral treatment. *Am J Clin Pathol* 2004; 122(3): 428-433.

VALLET-PICHARD A et al. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. **Hepatology** 2007; 46(1): 32-6.

VAN DER MEER AJ et al. Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. **JAMA** 2012; 308: 2584-93.

WAI CT et al. A simple non-invasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology** 2003; 38: 518-526.

WANG CC et al. Fibrosis index based on four factors better predicts advanced fibrosis or cirrhosis than aspartate aminotransferase/platelet ratio index in chronic hepatitis C patients. **Journal of the Formosan Medical Association** 2015; 114: 923-928.

WELLER R et al. Hepatitis C Virus Strain-Dependent Usage of Apolipoprotein E Modulates Assembly Efficiency and Specific Infectivity of Secreted Virions. **J Virol** 2017; 91: e00422-17.

WESTBROOK RH, Dusheiko G. Natural History of Hepatitis C. **Journal of Hepatology** 2014; 61(1 Suppl): S58-68.

WHITCOMBE D et al. A homogeneous fluorescence assay for PCR amplicons: its application to real-time, single-tube genotyping. **Clin Chem** 1998; 44: 918-23.

WIESNER RH et al. MELD and PELD: application of survival models to liver allocation. **Liver Transpl** 2001; 7:567.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the Screening Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis C Infection: Updated Version Guidelines for the Screening Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis C Infection. **Geneva** 2016.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection. **Geneva** 2018.

WOZNIAK MA et al. Apolipoprotein E-epsilon 4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus. **Hepatology** 2002; 36: 456-463.

WOZNIAK MA et al. Apolipoprotein E-epsilon4 deficiency and cognitive function in hepatitis C virus-infected patients. **J Viral Hepat** 2016; 23: 39-46.

WU JT. Serum alpha-fetoprotein and its lectin reactivity in liver disease: A review. **Ann Clin Lab Sci** 1990; 20:98.

YANG MH et al. The relationship between apolipoprotein E polymorphism, lipoprotein (a) and fatty liver disease. **Hepato gastro enterology**. 2005; 52: 1832-1835.

YANG Z et al. Neglected but Important Role of Apolipoprotein E Exchange in Hepatitis C Virus Infection. **J Virol** 2016; 90: 9632-9643.

YAO FY et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. **Hepatology** 2001; 33(6): 1394-1403.

YAO FY et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: comparison of the proposed UCSF criteria with the Milan criteria and the Pittsburgh modified TNM criteria. **Liver Transpl** 2002; 8(9): 765-774.

YEN YH et al. APRI and FIB-4 in the evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients stratified by AST level. **PLoS One** 2018;13: e0199760.

YILMAZ Y et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis with the aspartate transaminase to platelet ratio index (APRI): Usefulness in patients with chronic liver disease: APRI in chronic liver disease. **Hepat Mon** 2011; 11(2): 103-6.

YOKOYAMA Y et al. Protein level of apolipoprotein E increased in human hepatocellular carcinoma. **Int J Oncol** 2006; 28: 625-631.

ZHANG B, Yang B. Combined alpha fetoprotein testing and ultrasonography as a screening test for primary liver cancer. **J Med Screen** 1999; 6(2): 108-10.

ZHANG Y et al. A monomeric, biologically active, full-length human apolipoprotein E. **Biochemistry** 2007; 46(37): 10722-32.

ZANNIS VI et al. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. **Journal of lipid research** 1982; 23(6): 911-4.

ZHONG Li et al. A rapid and cost-effective method for genotyping apolipoprotein E gene polymorphism. **Molecular Neurodegeneration** 2016; 11: 2.

ANEXOS

ANEXO 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado pelo pesquisador, José Carlos Rodrigues Nascimento, Estudante do doutorado do programa de ciências médicas da Universidade Federal do Ceará, a participar da pesquisa intitulada “**Polimorfismo da apolipoproteína E na cirrose hepática induzida pelo vírus da hepatite C com ou sem carcinoma hepatocelular no perioperatório de transplante ortotópico de fígado.**” Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos. Este estudo tem como objetivo avaliar a ação da apolipoproteína E, na doença crônica do fígado causada por hepatite C (doença que deixa a pessoa com a pele amarelada, fraqueza, perda de peso e barriga d’água), associada ou não a câncer de fígado. A apolipoproteína E é uma glicoproteína formada por proteína e açúcar que tem muitas funções, podendo proteger as pessoas de algumas doenças ou por outro lado, ela pode ajudar a causar algumas doenças nas pessoas.

Para isso precisamos que o senhor (a), responda doze perguntas contidas no nosso questionário como: a causa da sua doença, a sua idade, o seu peso, a sua altura, o seu tipo de sangue e se tem outras doenças como (pressão alta, diabetes, no coração, na pele/mucosa, nos rins e na cabeça), e permita a coleta através dos prontuários dos resultados dos seus exames. Assim como, também faça a escovação da sua boca na parte interna da bochecha, este material da escovação será utilizado para estudar, qual o tipo da apolipoproteína E é mais comum nessa doença. O senhor (a) vai apenas responder as perguntas, que serão lidas e anotadas pelo pesquisador. Todas estas atividades serão realizadas durante um tempo de 30 minutos.

Suas respostas assim como os seus exames e o escovado da boca serão tratados de forma anônima e confidencial, isto é, em nenhum momento será divulgado o seu nome em qualquer fase do estudo. Os dados coletados serão utilizados apenas nesta pesquisa e os resultados divulgados em eventos e/ou revistas científicas.

Esta pesquisa poderá trazer riscos como o constrangimento em participar da pesquisa e durante a escovação com escova limpa (estéril) e descartável fornecida pelo pesquisador, possa ocorrer pequenos pontos de sangramento na parte interna da bochecha, sendo este procedimento suspenso e tratado através da lavagem da boca com água gelada, sem a necessidade de tomar sangue e sem precisar transferir para um hospital. Na verdade, essa escova evita traumatismos e sangramentos, não causa doença, é macia, é resistente e é composta de cerda fixada em haste (cabo) plástica, a haste mede 180 mm, tem 200 mm de comprimento total, será usada apenas uma vez e em uma única pessoa, sendo depois jogada no lixo.

Se você aceitar participar estará contribuindo para a possível descoberta de um tratamento para essa doença. Pois apesar de alguns estudos evidenciarem a influência desta glicoproteína em doenças do fígado, é evidente a falta de estudos, que avaliem a sua ação na doença do fígado causada pelo vírus da hepatite C associado ao câncer de fígado.

Se depois de consentir o Sr. (a) quiser desistir, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento antes da realização do estudo do escovado da boca, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa e ao seu tratamento. O (a) Sr. (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr. (a) poderá entrar em contato com o pesquisador pelo endereço do responsável pela pesquisa:

Nome: José Carlos Rodrigues Nascimento

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFC.

Endereço: Rua Monsenhor Furtado s/n - Rodolfo Teófilo - CEP 60441-750 - Fortaleza - CE (Campus do Porangabuçu).

Telefones para contato: (85) 3366 8208 / (85)99668 8500

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira).

O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado _____, ____ anos, RG: _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, ____/____/____

Nome do participante da pesquisa

Data

Assinatura

Nome do pesquisador

Data

Assinatura

Nome da testemunha
(se o voluntário não souber ler)

Data

Assinatura

Nome do profissional
que aplicou o TCLE

Data

Assinatura

ANEXO 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (a) senhor (a) está sendo convidado (a) para participar, de forma voluntária, da pesquisa intitulada: **“Polimorfismo da apolipoproteína E na cirrose hepática induzida pelo vírus da hepatite C com ou sem carcinoma hepatocelular no perioperatório de transplante ortotópico de fígado”**, que está sob a responsabilidade do pesquisador: José Carlos Rodrigues Nascimento e tem como objetivos: Avaliar a influência da apolipoproteína E, na causa da cirrose hepática crônica por vírus C associado ao câncer de fígado. Esta apolipoproteína E é uma glicoproteína, que pode causar hepatite C, doença de Alzheimer, tuberculose pulmonar, diarreia infantil e herpes labial.

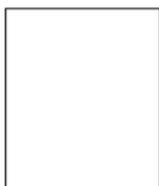
Para isso precisamos que o senhor (a), responda algumas perguntas contidas no nosso questionário, permita a coleta através dos prontuários dos resultados de exames. Assim como, também de células bucais através da escovação para estudar, qual o tipo da apolipoproteína E é mais comum nesta doença.

Suas respostas assim como os seus exames e o escovado da boca serão tratados de forma anônima e confidencial, isto é, em nenhum momento será divulgado o seu nome em qualquer fase do estudo. Os dados coletados serão utilizados apenas nesta pesquisa e os resultados divulgados em eventos e/ou revistas científicas.

Esta pesquisa poderá trazer risco, mas se ocorrer sangramento oral em pacientes com distúrbios de coagulação, durante a escovação da superfície da bochecha com escova fornecida pelo pesquisador, para coleta de células bucais, este procedimento será suspenso e tratado através da lavagem da boca com água gelada.

Se você aceitar participar estará contribuindo para a possível descoberta de um tratamento para esta doença. Pois apesar de alguns estudos evidenciarem a influência desta glicoproteína em doenças do fígado, é evidente a falta de estudos, que avaliem a sua ação na cirrose hepática por vírus C associado à hepatocarcinoma. Podendo o Sr. (a) interromper o procedimento se assim desejar. A sua participação é de caráter voluntário, isto é, a qualquer momento o (a) Sr. (a) pode recusar-se a responder qualquer pergunta ou desistir de participar e retirar seu consentimento, entrando em contato com o responsável pela pesquisa (José Carlos Rodrigues Nascimento), pelo telefone (85)9966-88500. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é formado de um grupo de profissionais de diversas áreas, cuja função é avaliar as pesquisas com seres humanos. O CEP foi criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa e também, dos pesquisadores. Qualquer dúvida ética o Sr. (Sra.) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral de Fortaleza, fone: 3101 7078. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é feito em duas vias, no qual o Sr. (Sra.) terá uma via e não terá nenhum custo ou quaisquer compensações financeiras.



Fortaleza, ____ de _____ de _____

Participante da pesquisa: Digitais caso não assine

Pesquisador responsável pela coleta dos dados
Rubrica:

ANEXO 3. INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

IDENTIFICAÇÃO POR CÓDIGO: _____

DIAGNÓSTICO: _____

SEXO: _____ TIPO SANGUÍNEO: _____ MELD: _____

PESO: _____ IDADE: _____ DATA: _____

ALTURA: _____ SCORE CHILD`S-PUGH: _____

COMORBIDADES: _____

Marcadores sorológicos e exames laboratoriais	Valores
Anti-HCV	
HCV-RNA	
Alfa-fetoproteína	
Hemograma (hemoglobina / hematócrito / plaquetas).	
Bilirrubinas (BT / BI / BD).	
Coagulograma (TAP / TTPA / INR).	
TGO / TGP / Gama GT / Proteínas totais	
Fosfatase alcalina / Triglicerídeos	
Colesterol total e frações (HDL / LDL)	
Ureia / Creatinina / Proteína C reativa	
Na ⁺ / K ⁺ / Cl ⁻ / Ca ²⁺	
Gasometria.	

Critérios de Milão	Hepatocarcinoma
Nódulo único < 5 cm, ou até 3 nódulos < 3 cm.	
Critérios expandidos	

Pontuação de METAVIR	Biópsia hepática
Atividade histológica (A0, A1, A2 e A3)	
Grau de Fibrose (F0, F1, F2, F3 e F4)	

ANEXO 4. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (PROPESQ-UFC)

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Genotipagem da apolipoproteína E na cirrose hepática causada pelo vírus da hepatite C associado com hepatocarcinoma.

Pesquisador: José Carlos Rodrigues Nascimento

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 63647816.1.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.018.768

Apresentação do Projeto:

Estudo observacional, descritivo e transversal que será realizado no laboratório da UPC/IBIMED-UFC, através da genotipagem dos alelos da ApoE, a partir de duas técnicas: A PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e a PCR TaqMan APOE, utilizando amostras de células bucais dos pacientes com diagnóstico de cirrose crônica por vírus C associados com HCC, que foram listados na fila de espera de Transplante Hepático do Hospital Geral de Fortaleza e do Hospital Walter Cantídeo, e aqueles que serão listados durante o período do estudo no momento do atendimento de janeiro de 2017 a dezembro de 2019, para analisar a influência dos alelos da ApoE na extensão da lesão hepática. Serão incluídos 150 pacientes, tendo como critérios de inclusão pacientes de ambos os sexos, de idade entre 40 a 70 anos e com diagnóstico de cirrose hepática por vírus C associado com HCC. Os critérios de exclusão serão: A recusa do paciente, presença de comorbidades como (diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, insuficiência renal crônica e doenças coronarianas), presença de metástase e trombose da veia porta pelo tumor. Os dados demográficos e a etiologia de cada paciente serão registrados. Para diagnóstico da hepatite por vírus C, serão dosados os marcadores sorológicos como o antiHCV e HCVRNA, o estadiamento do tumor será através da dosagem da alfa-fetoproteína e serão colhidos os exames adicionais como: Hemograma, bilirrubinas, coagulograma, TGO, TGP, sódio, potássio, fosfatase

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 2.018.768

FORTALEZA, 17 de Abril de 2017

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

ANEXO 5. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL GERAL DE FORTALEZA.

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>HOSPITAL GERAL DE FORTALEZA/SUS</p> </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div>								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
Elaborado pela Instituição Coparticipante								
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA								
Título da Pesquisa: Genotipagem da apolipoproteína E na cirrose hepática causada pelo vírus da hepatite C associado com hepatocarcinoma.								
Pesquisador: José Carlos Rodrigues Nascimento								
Área Temática:								
Versão: 1								
CAAE: 63647816.1.3001.5040								
Instituição Proponente: Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará								
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio								
DADOS DO PARECER								
Número do Parecer: 2.062.278								
Apresentação do Projeto:								
Hepatite C é a inflamação do fígado decorrente de infecção pelo vírus da hepatite C (VHC), que causa doença hepática crônica levando a situações de risco de vida como o hepatocarcinoma (HCC) e a cirrose. Dificilmente, o HCC aparece na ausência de cirrose, sendo que todas as causas etiológicas da mesma podem ter complicações pelo desenvolvimento do tumor, apresentando risco maior nos pacientes com hepatite por infecção, principalmente, VHC. Assim, tem sido bem documentado que a apolipoproteína E (ApoE) é expressa principalmente nos hepatócitos e a sua importância na influência da cirrose hepática por vírus C associado a HCC, é desconhecida. No presente estudo, examinaremos a influência dos três alelos principais (2, 3 e 4) do gene da ApoE, na influência da cirrose hepática por vírus C associado a HCC.								
Objetivo da Pesquisa:								
Avaliar a influência dos três alelos principais (2, 3 e 4) do gene da apolipoproteína E, na cirrose hepática por vírus C associado com hepatocarcinoma								
Avaliação dos Riscos e Benefícios:								
Esta pesquisa poderá trazer riscos como o constrangimento em participar da pesquisa e durante a escovação com escova limpa (estéril) e descartável fornecida pelo pesquisador, possa ocorrer								
Situação do Parecer:								
Aprovado								
Necessita Apreciação da CONEP:								
Não								
<p>FORTALEZA, 14 de Maio de 2017</p> <hr style="width: 20%; margin: 0 auto;"/> <p style="text-align: center;">Assinado por: Ivana Lima Verde Gomes (Coordenador)</p>								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>Endereço: Rua Avila Goulart, nº 900</td> <td>CEP: 60.155-290</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Papicu</td> <td>Município: FORTALEZA</td> </tr> <tr> <td>UF: CE</td> <td>E-mail: cep@hgf.ce.gov.br</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (85)3101-7076</td> <td>Fax: (85)3101-3163</td> </tr> </table>	Endereço: Rua Avila Goulart, nº 900	CEP: 60.155-290	Bairro: Papicu	Município: FORTALEZA	UF: CE	E-mail: cep@hgf.ce.gov.br	Telefone: (85)3101-7076	Fax: (85)3101-3163
Endereço: Rua Avila Goulart, nº 900	CEP: 60.155-290							
Bairro: Papicu	Município: FORTALEZA							
UF: CE	E-mail: cep@hgf.ce.gov.br							
Telefone: (85)3101-7076	Fax: (85)3101-3163							
Página 04 de 04								

ANEXO 6. APROVAÇÃO A EMENDA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (PROPESQ-UFC).

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DA APOLIPOPROTEÍNA E NA CIRROSE HEPÁTICA POR VÍRUS DA HEPATITE C ASSOCIADO OU NÃO A HEPATOCARCINOMA NO PERIOPERATÓRIO DE TRANSPLANTE HEPÁTICO.

Pesquisador: José Carlos Rodrigues Nascimento

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 63647816.1.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.525.828

Apresentação do Projeto:

A referida emenda tem por justificativa:

1. Mudança do Título: INFLUÊNCIA DA APOLIPOPROTEÍNA E NA CIRROSE HEPÁTICA POR VÍRUS DA HEPATITE C ASSOCIADO OU NÃO A HEPATOCARCINOMA NO PERIOPERATÓRIO DE TRANSPLANTE HEPÁTICO.
2. Incluir pacientes com cirrose por vírus da hepatite C crônica associado ou não a hepatocarcinoma no perioperatório de transplante hepático
3. Critérios de exclusão: Recusa do paciente, paciente inconsciente, presença de metástase e trombose da veia porta pelo tumor
4. Acrescentar os exames laboratoriais: Fosfatase alcalina, gama GT, albumina, colesterol total, HDL, LDL, triglicérides, proteína C reativa e proteínas totais
5. OBJETIVOS
 - 5.1: Geral Avaliar a influência dos três alelos principais (2, 3 e 4) do gene da apolipoproteína E, na cirrose hepática crônica por vírus C associado ou não a hepatocarcinoma no perioperatório de transplante hepático.
 - 5.2: Específicos - Analisar a influência dos alelos (2, 3 e 4) da ApoE na cirrose hepática crônica por vírus C associado ou não a hepatocarcinoma, conforme:
 1. Os critérios de Milão.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 2.525.828

FORTALEZA, 05 de Março de 2018

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

MANUSCRITOS

MANUSCRITOS 1. PUBLICADOS EM REVISTA

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2020) 53(6): e9031, <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20209031>

ISSN 1414-431X Research Article



1/9

A Brazilian regional basic diet-induced chronic malnutrition drives liver inflammation with higher ApoA-I activity in C57BL6J mice

M.J.S. Santos¹, K.M. Canuto¹, C.C. de Aquino¹, C.S. Martins², G.A.C. Brito², T.M.R.P. Pessoa⁵, L.R. Bertolini⁵, I. de Sá Carneiro⁵, D.V. Pinto¹, J.C.R. Nascimento¹, B.B. da Silva³, J.T. Valença Jr.⁶, M.I.F. Guedes³, J.S. Owen⁴, and R.B. Oriá^{1,2}

¹Laboratório da Biologia da Cicatrização Tecidual, Ontogenia e Nutrição de Tecidos, Departamento de Morfologia e Instituto de Biomedicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

²Núcleo de Microscopia e Processamento de Imagens, Departamento de Morfologia e Instituto de Biomedicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

³Laboratório de Biologia e Biotecnologia Molecular, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

⁴Division of Medicine, Royal Free Campus, University College London Medical School, Hampstead, London, United Kingdom

⁵Ciências da Saúde, Universidade de Fortaleza, Fortaleza, CE, Brasil

⁶Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

Abstract

Malnutrition is still considered endemic in many developing countries. Malnutrition-enteric infections may cause lasting deleterious effects on lipid metabolism, especially in children living in poor settings. The regional basic diet (RBD), produced to mimic the Brazilian northeastern dietary characteristics (rich in carbohydrate and low in protein) has been used in experimental malnutrition models, but few studies have explored the effect of chronic RBD on liver function, a central organ involved in cholesterol metabolism. This study aimed to investigate whether RBD leads to liver inflammatory changes and altered reverse cholesterol metabolism in C57BL6/J mice compared to the control group, receiving a standard chow diet. To evaluate liver inflammation, ionized calcium-binding adapter protein-1 (IBA-1) positive cell counting, interleukin (IL)-1 β immunohistochemistry, and tumor necrosis factor (TNF)- α and IL-10 transcription levels were analyzed. In addition, we assessed reverse cholesterol transport by measuring liver apolipoprotein (Apo)E, ApoA-I, and lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) by RT-PCR. Furthermore, serum alanine aminotransferase (ALT) was measured to assess liver function. RBD markedly impaired body weight gain compared with the control group ($P < 0.05$). Higher hepatic TNF- α ($P < 0.001$) and IL-10 ($P < 0.01$) mRNA levels were found in RBD-challenged mice, although without detectable non-alcoholic fatty liver disease. Marked IBA-1 immunolabeling and increased number of positive-IBA-1 cells (presumably Kupffer cells) were found in the undernourished group. No statistical difference in serum ALT was found. There was also a significant increase in ApoA-I mRNA expression in the undernourished group, but not ApoE and LCAT, compared with the control. Altogether our findings suggested that chronic RBD-induced malnutrition leads to liver inflammation with increased ApoA-I activity.

Key words: Liver; Hyperlipidemia; Malnutrition; Inflammation; Kupffer cells; Apolipoprotein A-I

Introduction

Malnutrition is still endemic in many parts of the developing world where poverty coexists with infectious diseases, much of it associated with precarious sanitation and hygiene (1). Malnutrition is a health issue particularly in growing children, especially in the first two years of life, when they undergo rapid cognitive and physical development (2,3). Very often malnutrition increases the risk for enteric infections and vice-versa (4), so that the condition may create a self-amplifying vicious cycle that impairs

growth and brain function by reducing intestinal nutrient absorption and increasing nutrient loss (5). Prolonged infection/malnutrition per se may increase daily nutrient requirements much more than the needs of a healthy child. A metabolomics study from Preidis and colleagues has shown that neonatal malnutrition leads to liver inflammation and increased oxidative stress in suckling mice (6). In addition, Wistar rats receiving a low protein diet show growth impairment, edema, liver steatosis,

Correspondence: R.B. Oriá: <oria@ufc.br>

Received July 4, 2019 | Accepted March 23, 2020

Braz J Med Biol Res | doi: 10.1590/1414-431X20209031

hypoalbuminemia, and anemia, which are common characteristics of human kwashiorkor (7). In many developing countries, the composition of diets available to weaning children features both low protein and high carbohydrate concentrations (8,9), including the Brazilian semi-arid northeast, one of the poorest regions in the country (10). Our group has utilized the regional basic diet (RBD), enriched in carbohydrate and with low protein concentration, to induce experimental malnutrition with disrupted intestinal barrier function (11) and then assessed intestinal inflammatory markers (12). Chronic malnutrition-driven stunting has been recognized to be associated with low-grade systemic inflammation in children (13).

A high-carbohydrate diet may overload liver functioning and amplify the low-grade inflammatory insult due to chronic low-protein malnutrition. Chronic malnutrition/infection states early in life may predispose to obesity and metabolic syndrome later (14). The mechanisms are mostly unknown but may involve long-term changes in liver metabolic function. Indeed, the effect of malnutrition on hepatic reverse cholesterol transport has not been explored. In this study, we have addressed whether the RBD, as a model of chronic malnutrition in weaning mice, could have a pro-inflammatory effect on the liver, with a focus on reverse cholesterol transport, which may have long-term consequences on liver metabolism with aging.

Material and Methods

Animals

C57BL/6J mice weighing 5–8 g were obtained from the State University of Ceará vivarium and housed in polypropylene boxes with free access to diet and water, under controlled temperature and humidity, and 12-h light/dark cycle in ventilated boxes. Immediately after weaning (21 days of life), experimental mice were randomly divided into two groups. A nourished group received a standard chow diet and the other group received an isocaloric RBD

for forty days. The body weights were monitored every three days. RBD is a well-studied rodent diet high in carbohydrates and marginally deficient in protein, fat, and minerals. It was formulated according to Teodósio et al. (10) to represent the multideficient diet of poor populations in northeastern Brazil. RBD and commercial chow (Puro lab 22PB[®], Brazil) diets present the following nutrients, respectively: protein (7 and 22%), carbohydrate (88 and 65%), and fat (5 and 15%) (Table 1). All experimental mice were euthanized by decapitation on post-natal day 61, after being previously anesthetized with ketamine (8 mg/100 g) and xylazine (0.8 mg/100 g).

All experimental protocols were in compliance with the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and the Institutional Animal Care and Use Committee guidelines from the State University of Ceará.

Histopathological scores

Slides containing liver hematoxylin and eosin-stained 5- μ m-thick sections were used for histopathological analyses. To evaluate non-alcoholic hepatitis, a histopathological scoring was used as described by Kleiner et al. (15) and the Pathology Subcommittee of the NASH Clinical Research Network. The samples were analyzed by a trained pathologist, blinded to the research groups, according to Table 2. Cell ballooning was measured by

Table 2. Histopathological scoring according to Kleiner et al. (15), depending on the extension and involvement of the hepatic parenchyma.

Degree	Parenchymal impairment
0	Absent (up to 5%)
1	Low (5 to 33%)
2	Moderate (34 to 66%)
3	High (More than 66%)

Table 1. Nutritional composition (g/g%) of the multideficient regional basic diet (RBD) and the standard commercial control diet.

	Standard commercial diet	Regional basic diet
Proteins	22.00	7.00
Carbohydrates	65.00	88.00
Lipids	15.00	5.00
Fibers	7.00	6.25
Minerals		
Ca ²⁺	1.20	0.65
Mg ²⁺	0.32	0.44
K ⁺	0.80	0.54
Na ⁺	0.27	0.25
Humidity	12.00	13.00
kcal/100g	407.10	408.10

the following scores: 0) no liver cells showing ballooning; 1) few cells showing ballooning; and 2) several liver cells showing prominent ballooning.

Serum alanine aminotransferase

Blood obtained by animal decapitation was transferred to Eppendorf tubes and allowed to coagulate at room temperature. The serum tubes were centrifuged (400 g) at 4°C for 3 min to separate the serum from the clotting debris. The sera were then stored in a freezer at -20°C for further serum alanine aminotransferase (ALT) analyses. ALT is a well-known biomarker of liver function. We used the Reitman and Frankel method for analysis (kit for colorimetric assay - LABTEST[®], Brazil).

qRT-PCR analyses

The liver tissue (30 mg) was macerated in Trizol reagent (Invitrogen[®], USA) with the aid of the Tissue-ruptor (Qiagen[®], USA). For complete RNA extraction, the manufacturer's instructions were followed (RNase mini extraction kit, Invitrogen[®]).

To prepare the cDNA, 1 µg of total RNA, treated with DNase (Ambion[®], USA), was used. Primers oligo (dT), dNTPs, and Super Script III enzyme were used following the manufacturer's instructions (Invitrogen[®]). RNA quantification was done using Nanodrop equipment (Thermo[®], USA). The qPCR reactions were performed with three biological replicates for each treatment. qRT-PCR was performed on StepOne Plus (Applied Biosystems[®], USA) equipment, with the following schedule: activation of the Taq DNA polymerase enzyme for 5 min at 94°C, 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C, and extension at 72°C for 30 s, with the collection of fluorescence data at each cycle. The amplification efficiency of the PCR was calculated from the slope of the linear regression equation obtained by the analysis software, according to the following equation: $E = 10^{-1/\text{slope}}$. The gene expression data, representative of the three independent biological replicates for each treatment, were submitted to analysis of variance. The means were compared and considered significantly different at 5% probability. All reactions were performed in duplicate and normalized by threshold fluorophore. For interleukin

(IL)-10 and tumor necrosis factor (TNF)- α , CT values were normalized by the level of β -actin. For the relative quantification of ApoA-I, ApoE, and LCAT, RPLP0 was used as the reference gene.

Ten microliters of Master Mix (SYBR Green Real-Time PCR Master Mix, Life Technologies[®], USA), 5 µL of cDNA, 2 µL of oligonucleotides, and 3 µL of ultrapure water were used in the reactions. The oligonucleotides used were synthesized (Life Technologies[®]) from sequences deposited in a specific database (16). The sequences of the oligonucleotides used are shown in Table 3.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry for IBA-1, ApoA-I, and IL-1 β was performed using the streptavidin-biotin-peroxidase method. The tissues were dehydrated in alcohol and then included in paraffin. Serial sections of 4 µm were placed on L-polylysine-coated slides, suitable for immunohistochemistry. The sections were dewaxed, hydrated in xylene and alcohol, and immersed in 0.1 M citrate buffer (pH 6.0) in a water bath for 20 min for antigen recovery at 65°C. After cooling at room temperature for 20 min, sections were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), and blocked with endogenous peroxidase with 3% H₂O₂ solution (20 min). Protein blocking was then performed with 5% BSA (bovine serum albumin) for 40 min. The sections were incubated overnight with goat anti-IBA-1 primary antibody (ABCAM[®], USA) diluted 1:100 in antibody diluent. After PBS washing, sections were incubated with biotinylated goat IgG diluted 1:400 (Santa Cruz[®], USA) for 30 min. After washing, the sections were incubated with streptavidin conjugated peroxidase complex (Santa Cruz[®] ABC complex) for 30 min. After further washing with PBS, sections were stained with chromogen 3,3'-diaminobenzidine peroxide (DAB) and counterstained with Mayer's hematoxylin and cover-slipped. Negative controls were processed simultaneously as described above, with the primary antibody being replaced with 5% PBS-BSA.

For IBA-1 positive cell counting, 10 magnification fields ($\times 400$) per histological section (each mouse) were used. Immunohistochemistry images were captured using a light microscope (Leica, Germany) coupled to a camera with

Table 3. Primers used for the RT-qPCR analyses.

Gene	Forward	Reverse	Genebank reference
APOE	CTTCTGGGATTACCTGCGCTGG	GTAGATCCTCCATGTCGGCT	NM_009696
ApoA-I	TCAAAGACAGCGGAGAGAC	CACCTTCTGGCGGTAGAGCTC	NM_009692
LCAT	CTGGCTCCTCAATGTGCTCTTC	AGGCCGTGTGTGGTTACTGAGT	NM_008490
RPLP0	GCTTCATTGTGGAGCAGACA	CATGGTGTCTTGCCCATCAG	RTPrimerDB ID 1261
IL-10	AAAGCAAGGCAGTGGAGCAG	TCAAACCTATTATGGCCTTGT	NM_012854
TNF- α	TCGAGTGACAAGCCGTAGC	CTCAGCCACTCCAGCTGCTC	HQ 201305.1
β -actin	CCCTGGCTCCTAGCACCAT	GAGCCACCAATCCACACAGA	NM_031144.3

LAZ 3,5 acquisition system (Leica DM1000). Positive cells were counted from high resolution-digitalized images with the aid of Image J software (NIH, USA).

Statistical analyses

Data are reported as means ± SE. Two-way ANOVA was used to analyze weight gain data and the unpaired Student's *t*-test was used for the remaining analyses. *P* < 0.05 was set to indicate significant differences.

Results

Body weight gain

RBD induced a profound reduction in body weight gain compared to the nourished control group (*P* < 0.05) as soon as the fourth day under RBD-feeding and throughout the remaining experimental protocol. There was no significant weight loss in the undernourished mice, but a slow weight gain pace, almost reaching a plateau. Thus, RBD feeding induced a chronic malnutrition condition (Figure 1).

Histopathological scoring

In the histopathological analysis, no difference was found in steatosis markers (hepatocyte ballooning and

micro or macrovesicular changes) between the experimental groups, however increased hepatocyte microvesicular changes were seen more prominently in some undernourished mice (Table 4). No significant difference was found in serum ALT between groups.

Inflammatory markers

Significantly increased IL-1β immunostaining was observed in the liver of mice receiving RBD compared to the nourished controls. There was greater IL-1β immunostaining in the overall hepatic parenchyma, including the majority of hepatocytes (Figure 2A). In addition, prolonged feeding with RBD caused a marked increase in TNF-α (*P* < 0.001) and reduction in IL-10 (*P* < 0.01) transcriptional levels, compared to the controls that received the standard diet (Figure 2B and C).

The liver from undernourished mice showed increased IBA-1 immunolabeling (depicted by increased brown staining), indicating more activated Kupffer cells (liver macrophages) (Figure 3). Furthermore, a higher count of IBA-1-positive cells was found in the undernourished group (*P* < 0.001) (Figure 3C). Interestingly, many hepatocytes from RBD-challenged mice showed hypertrophic and polypoid (indicated by more binucleated cells) characteristics (Figure 3B).

Reverse cholesterol transport

We assessed some markers of liver reverse cholesterol transport by analyzing ApoE, ApoA-I, and LCAT transcriptional levels. No significant change was found for ApoE and LCAT; however, there were increased ApoA-I mRNA levels in the RBD-challenged liver compared to the nourished control (*P* < 0.05) (Figure 4D). In addition, higher ApoA-I immunolabeling was found in liver histological sections of the RBD group compared to the nourished control.

Discussion

Several methods to induce long-term post-natal malnutrition and growth impairment have been described in

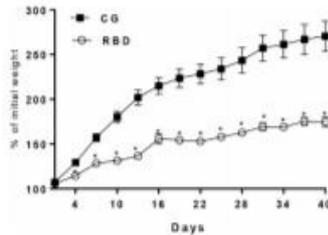


Figure 1. Weight gain (% of initial weight) every 3 days of C57BL6J nourished (control group, CG) and regional basic diet (RBD) undernourished mice during 40 days of dietary intervention. Data are reported as means ± SE. **P* < 0.05, two-way ANOVA.

Table 4. Histopathological liver scores in C57BL6J nourished and undernourished mice following 40 days of dietary intervention.

Groups	Scores		
	Steatosis		Ballooning
	Macrovesicular	Microvesicular	
Nourished (n=3)	0 (0)	0 (0-1)	1 (1)
Undernourished (n=6)	0 (0-1)	2 (0-3)	1 (1-2)

Data are reported as median (range). There were no significant differences between the groups (Mann-Whitney test), however, changes were more pronounced in the undernourished mice.

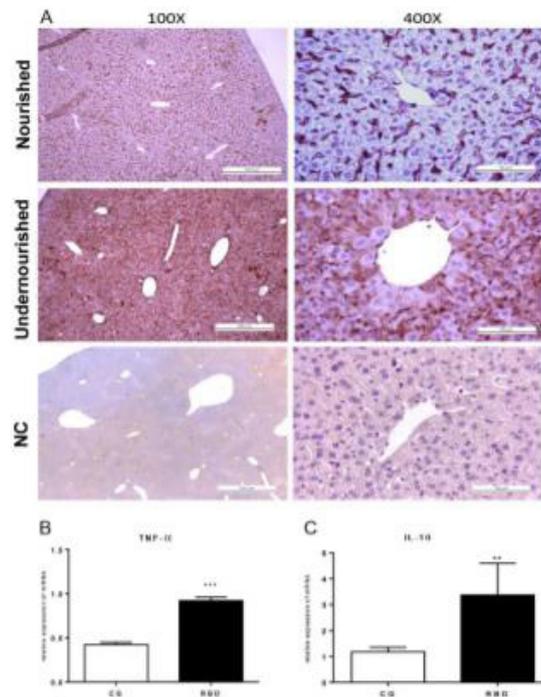


Figure 2. A, Representative panel of interleukin (IL)-1 β immunostaining of liver tissue of the experimental groups after 40 days of dietary intervention. Control (nourished, CG) and regional basic diet (RBD) groups in low ($\times 100$, scale bar 200 μ m) and high magnification ($\times 400$, scale bar 50 μ m). The negative control (NC) without the target antibody is also depicted. B and C, Tumor necrosis factor (TNF)- α and IL-10 transcription by RT-qPCR using β -actin as the reference gene. Data are reported as means \pm SE for $n=6$ per group. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, unpaired Student's *t*-test.

the literature. Among the most commonly used are: food restriction, gradual withdrawal of the offspring during lactation (17,18), adjustment of the litter size (19), and induction of low-protein malnutrition through the use of protein-deficient diets (20). Recently, much attention has been paid to the environmental enteric dysfunction condition (EED), which may cause low-grade systemic inflammation in chronically undernourished children (21). The burdensome EED is highly prevalent in the developing world and may additionally increase the risk for metabolic disease and obesity with aging (14,22). This condition still lacks good animal models.

The RBD was developed after a food intake survey conducted by the Federal University of Pernambuco in Northeastern Brazil to evaluate the effect of intrauterine malnutrition (10). A remarkable impairment in body weight

gain was observed in the RBD-challenged Wistar rats for 14 days, and the sustained weight decrease was not reversed even after zinc supplementation. In addition, RBD induced an intestinal-to-blood bacterial translocation, shown by an increased number of bacteria colony forming units in the spleen and mucosal inflammation (12).

Although RBD has been used in several studies, none of those has investigated the possible changes that this diet can cause in the liver. This is important as RBD-induced inflammatory changes in the liver could alter the reverse cholesterol transport, leading to hypertriglyceridemia and the risk for developing cardiovascular diseases. The work of Preidis and colleagues has identified important metabolic alterations in undernourished mice, subjected to neonatal maternal separation, including evidence of muscle and adipose tissue catabolism, as

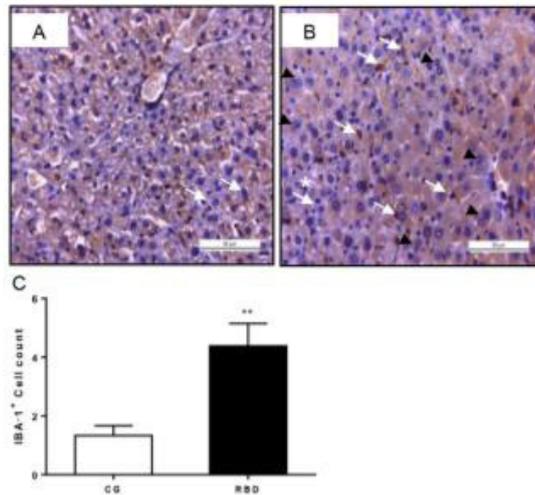


Figure 3. Representative liver ionized calcium-binding adapter protein-1 (IBA-1) immunostaining of the experimental groups, following 40 days of dietary intervention. **A**, Control nourished and **B**, regional basic diet (RBD) groups in high magnification ($\times 400$, scale bar 50 μm). White arrows indicate binucleated hepatocytes. Black arrowheads indicate IBA-1-positive cells. The asterisk indicates parenchyma disruption. Note lack of glycogen stores (seen by poorly stained cytoplasm in the nourished hepatic cells) and hepatocyte hypertrophy in the RBD-challenged liver. **C**, IBA-1-positive cell count. Data are reported as mean \pm SE for $n=6$ per group. ** $P < 0.01$, unpaired Student's *t*-test.

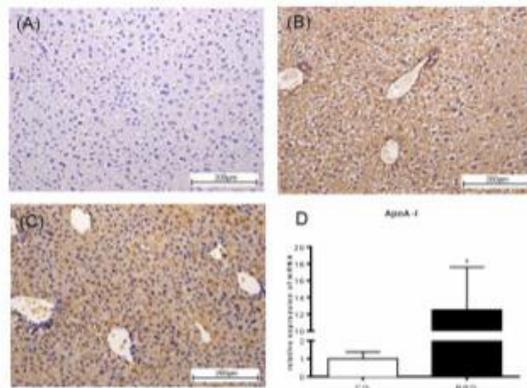


Figure 4. Representative liver ApoA-I immunostaining of the experimental groups, following 40 days of dietary intervention. **A**, Negative control. **B**, Nourished (CG) and **C**, regional basic diet (RBD) groups ($\times 100$, scale bar 200 μm). **D**, Liver ApoA-I transcriptional level from nourished and RBD-undernourished mice following 40 days of dietary intervention. Data are reported as means \pm SE for $n=6$ per group. * $P < 0.05$, unpaired Student's *t*-test.

well as liver and bile abnormalities, oxidative stress, and inflammation (6). Findings that support that malnutrition can lead to important changes in liver cholesterol metabolism are important to guide health policies in endemic areas.

Although studies have shown elevation of ALT serum levels in children afflicted with undernutrition (7), a serum ALT increase is not a universal finding in protein-energy undernourished children (23). In the studied animal model, ALT serum levels were not significantly affected by RBD-induced malnutrition.

Increased IBA-1-positive cells and higher transcription of pro-inflammatory cytokines in the liver from RBD-challenged mice suggested increased intestinal bacterial translocation and activation of Kupffer cells by bacterial products carried out from the liver by the portal circulation. Interestingly, intestinal gram-negative bacterial overgrowth in normal rats can increase Kupffer cells reactivity to lipopolysaccharide (LPS) and reduce hepatocyte protein synthesis. When cultured alone, Kupffer cells from these animals also produced more IL-1 and prostaglandin E2 in response to LPS (24).

The increase in liver IL-10 mRNA levels may be a counterbalance response to over-inflammation, as IL-10 can reduce T-cell secretion of IL-2, lower human leukocyte antigen II expression (HLA class II), and IL-1 β and TNF- α secretion by monocytes and macrophages during inflammation (25). Elevated serum IL-10 levels have been observed in newly-weaned mice receiving a 0.6% hypo-protein diet compared to controls (26).

The marked immunolabeling of IL-1 β in the liver parenchyma seen in the undernourished mice corroborated with findings of increased number of IBA-1 positive cells. Interestingly, in the work by de Queiroz and colleagues, RBD induced increased jejunum levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-10 in rats, compared to the nourished group, suggesting a systemic inflammatory effect. In that study, zinc supplementation was able to reduce levels of TNF- α and IL-10, but not IL-1 β in RBD-challenged mice compared with zinc untreated counterparts (12).

In a study with 7- and 8-week-old Swiss male mice fed either with a high-carbohydrate diet (64% carbohydrates, 19% protein, and 11% fat) or a high fat diet (45% carbohydrate, 17% protein, and 38% fat), the high-carbohydrate diet was able to raise the TNF- α plasma and liver levels (27). Likewise, in our study, chronic feeding with RBD, a diet enriched with high carbohydrate content (70.6%), compared to the standard diet (56%), increased TNF- α mRNA levels in the liver of mice.

In the liver, TNF- α is produced mainly by Kupffer cells, which are resident macrophages (28). Increased transcription of TNF- α in RBD-challenged mice is probably correlated with the increased number of Kupffer cells, as more IBA-1-positive liver cells were found, suggesting an activated inflammatory state in prolonged malnutrition.

Increased TNF- α serum levels have been documented in children with protein-energy malnutrition (29) and in the whole blood cultures from children with primary malnutrition (30), compared to well-nourished ones. In addition, Dewan et al., investigating the immune profile from 80 moderately to severely malnourished children receiving the WHO advocated diet for severe malnutrition (age one to five years), found increased serum TNF- α and IL-10 levels (31), again indicating a systemic inflammatory response.

Few studies have addressed the levels of apolipoproteins in protein-energy malnutrition. An early study from Feillet and colleagues reported low plasma total cholesterol, HDL, and LDL-cholesterol, but normal ApoA-I concentration in 39 children, aged between 9 and 44 months, with marasmus. The ApoAII/ApoA-I ratio did not differ from individuals in the control group; however, the triglyceride-rich lipoprotein particles LpC-III:B and LpE:B were significantly increased (32).

In our study, greater hepatic levels of ApoA-I mRNA were seen in RBD-challenged mice compared to controls, suggesting an increased mobilization of cholesterol from the tissues to the liver. As ApoA-I biosynthesis in the liver may be associated with a response to oxidative stress (33), increased ApoA-I transcriptional levels in undernutrition might be a compensatory response to protect against inflammation derived-free radicals. TNF- α has been shown to downregulate ApoA-I expression in hepatic cell lines, which may be reverted by PPAR- γ inhibitors (34). Our data showed increased liver ApoA-I mRNA levels regardless of the high TNF- α transcriptional activity. The reason for such observation is unknown but may indicate the need for more ApoA-I activity in the liver to overcome the inflammatory insult. Noteworthy is that ApoA-I is able to induce the secretion of IL-10 by monocytes (35) (and perhaps liver macrophages), which may further contribute to reduce excessive inflammation.

LCAT is responsible for the esterification of free cholesterol within HDL particles and its activity is strongly regulated by ApoA-I. In our malnutrition protocol with RBD, no difference was seen in LCAT transcription in the liver, however, we could not rule out a later effect with even worse chronic malnutrition. It has been shown that long-term feeding with protein-deficient diets (2% casein for 28 days) is able to reduce LCAT activity (but not HDL plasma levels nor ApoA-I levels) (36). The discrepancy from our findings may be due to different levels of protein malnutrition in our diet.

Interestingly, the liver from undernourished mice showed hypertrophied and polyploid hepatocytes. Both features have been found with decreased liver function and parasitic burden seen in cryptosporidiosis and might be a consequence of hepatocyte work overload and changes related to epigenetic programming (37). Long-term alterations in the liver cholesterol reverse transport may increase the likelihood of atherosclerotic harmful

effects with aging. When malnutrition-related intestinal-to-blood bacterial translocation occurs, production of phospholipid-rich very low-density lipoprotein might be increased by the liver (resulting in hypertriglyceridemia) to neutralize bacterial products with increased accumulation of cholesterol in cells, and if a chronic and repeated insult is present, it may initiate atherosclerotic lesions (38).

Although no alteration in ALT serum levels was seen nor liver steatosis (suggesting no significant liver dysfunction), altogether our findings indicated an inflammatory liver state (although subclinical) with altered hepatic ApoA-I expression, the latter as a potential compensatory response to protect against increased inflammation. Nonetheless, such malnutrition-related liver long-term changes may have pro-atherosclerotic effects with aging.

One limitation of this study is that the diets may have proteins of different quality, for example, a different amino acid profile and digestibility, which is difficult to

be standardized, which may have resulted in different weight gain and biochemical profiles of the experimental animals. However, socially disadvantaged populations in poor regions of Brazil likely face the same problem.

In conclusion, our overall data suggest that the chronic feeding with the RBD caused liver inflammation with increased hepatic ApoA-I expression. These findings may support ApoA-I as a potential therapeutic target in animal models of low-protein malnutrition. More mechanistic studies are warranted to further confirm and extend our results.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Guerrant RL, Oria RB, Moore SR, Oria MO, Lima AA. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. *Nutr Rev* 2008; 66: 487–505, doi: 10.1111/j.1753-4887.2008.00082.x.
- Tshala-Katumbay D, Mwanza JC, Rohlman DS, Maestre G, Oriá RB. A global perspective on the influence of environmental exposures on the nervous system. *Nature* 2015; 527: S187–S192, doi: 10.1038/nature16034.
- Prado EL, Dewey KG. Nutrition and brain development in early life. *Nutr Rev* 2014; 72: 267–284.
- Coutinho BP, Oria RB, Vieira CM, Sevilheja JE, Warren CA, Maciel JG, et al. *Cryptosporidium* infection causes undernutrition and, conversely, weaning undernutrition intensifies infection. *J Parasitol* 2008; 94: 1225–1232, doi: 10.1645/GE-1411.1.
- MacIntyre J, McTaggart J, Guerrant RL, Goldfarb DM. Early childhood diarrhoeal diseases and cognition: are we missing the rest of the iceberg? *Paediatr Int Child Health* 2014; 34: 295–307, doi: 10.1179/2046905514Y.0000000141.
- Preidis GA, Keaton MA, Campeau PM, Bessard BC, Conner ME, Hotez PJ. The undernourished neonatal mouse metabolome reveals evidence of liver and biliary dysfunction, inflammation, and oxidative stress. *J Nutr* 2014; 144: 273–281, doi: 10.3945/jn.113.183731.
- Etukudo M, Agbedana O, Akang E, Osifo B. Biochemical changes and liver tissue pathology in weaning Wistar albino rats with protein-energy malnutrition (PEM). *Afr J Med Med Sci* 1999; 28: 43–47.
- Faber M, Jogessar VB, Benade AJ. Nutritional status and dietary intakes of children aged 2-5 years and their caregivers in a rural South African community. *Int J Food Sci Nutr* 2001; 52: 401–411, doi: 10.1080/09637480120078285.
- Steyn NP, Mchiza Z, Hill J, Davids YD, Venter I, Hinrichsen E, et al. Nutritional contribution of street foods to the diet of people in developing countries: a systematic review. *Public Health Nutr* 2014; 17: 1363–1374, doi: 10.1017/S1368980013001158.
- Teodósio NR, Lago ES, Romani SA, Guedes RC. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr* 1990; 40: 533–547.
- Ueno PM, Oria RB, Maier EA, Guedes M, de Azevedo OG, Wu D, et al. *Alanyl*-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis *in vitro* and in a murine model of weaning undernutrition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 301: G612–G622, doi: 10.1152/ajpgi.00531.2010.
- de Queiroz CA, Fonseca SG, Frota PB, Figueiredo IL, Aragao KS, Magalhaes CE, et al. Zinc treatment ameliorates diarrhea and intestinal inflammation in undernourished rats. *BMC Gastroenterol* 2014; 14: 136, doi: 10.1186/1471-230X-14-136.
- Prendergast AJ, Rukobo S, Chasekwa B, Mutasa K, Ntozini R, Mbuya MN, et al. Stunting is characterized by chronic inflammation in Zimbabwean infants. *PLoS One* 2014; 9: e86928, doi: 10.1371/journal.pone.0086928.
- DeBoer MD, Lima AA, Oria RB, Scharf RJ, Moore SR, Luna MA, et al. Early childhood growth failure and the developmental origins of adult disease: do enteric infections and malnutrition increase risk for the metabolic syndrome? *Nutr Rev* 2012; 70: 642–653, doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00543.x.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van NM, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313–1321, doi: 10.1002/hep.20701.
- Lefever S, Vandesompele J, Speleman F, Pattyn F. RTPprimerDB: the portal for real-time PCR primers and probes. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: D942–D945, doi: 10.1093/nar/gkn777.
- Castro IC, Oliveira BB, Slowikowski JJ, Coutinho BP, Siqueira FJ, Costa LB, et al. Arginine decreases *Cryptosporidium parvum* infection in undernourished suckling mice involving nitric oxide synthase and arginase. *Nutrition* 2012; 28: 678–685, doi: 10.1016/j.nut.2011.09.011.

18. Florian ML, Nunes ML. Effects of intra-uterine and early extra-uterine malnutrition on seizure threshold and hippocampal morphometry of pup rats. *Nutr Neurosci* 2011; 14: 151–158, doi: 10.1179/147683010X12611460764804.
19. Ladd FV, Ladd AA, Ribeiro AA, Costa SB, Coutinho BP, Feitosa GA, et al. Zinc and glutamine improve brain development in suckling mice subjected to early postnatal malnutrition. *Nutrition* 2010; 26: 662–670, doi: 10.1016/j.nut.2009.11.020.
20. Costa LB, JohnBull EA, Reeves JT, Sevilleja JE, Freire RS, Hoffman PS, et al. Cryptosporidium-malnutrition interactions: mucosal disruption, cytokines, and TLR signaling in a weaned murine model. *J Parasitol* 2011; 97: 1113–1120, doi: 10.1645/JE-2848.1.
21. Morais MB, Silva GAPD. Environmental enteric dysfunction and growth. *J Pediatr (Rio J)* 2019; 95: S85–S94, doi: 10.1016/j.jped.2018.11.004.
22. Guerrant RL, DeBoer MD, Moore SR, Scharf RJ, Lima AA. The impoverished gut—a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10: 220–229, doi: 10.1038/nrgastro.2012.239.
23. Rao A, Cherian A, Onuora CU, Suvamabai PC. Serum aminotransferases and gamma-glutamyl transferase in protein energy malnutrition. *Trop Geogr Med* 1985; 37: 11–14.
24. Billiar TR, Maddaus MA, West MA, Curran RD, Wells CA, Simmons RL. Intestinal gram-negative bacterial overgrowth *in vivo* augments the *in vitro* response of Kupffer cells to endotoxin. *Ann Surg* 1988; 208: 532–540, doi: 10.1097/0000658-198810000-00015.
25. Mucellin S, Marincola F, Rossi CR, Nitti D, Lise M. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 61–76, doi: 10.1016/j.cytogfr.2003.11.001.
26. Monk JM, Woodward B. Elevated blood interleukin-10 levels and undiminished systemic interleukin-10 production rate prevail throughout acute protein-energy malnutrition in the weaning mouse. *Cytokine* 2009; 47: 126–131, doi: 10.1016/j.cyt.2009.05.015.
27. Ferreira AV, Mario EG, Porto LC, Andrade SP, Botion LM. High-carbohydrate diet selectively induces tumor necrosis factor-alpha production in mice liver. *Inflammation* 2011; 34: 139–145, doi: 10.1007/s10753-010-9217-0.
28. Cha JY, Kim DH, Chun KH. The role of hepatic macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Lab Anim Res* 2018; 34: 133–139, doi: 10.5625/lar.2018.34.4.133.
29. Giovambattista A, Spinedi E, Sanjurjo A, Chisari A, Rodrigo M, Perez N. Circulating and mitogen-induced tumor necrosis factor (TNF) in malnourished children. *Medicina (B Aires)* 2000; 60: 339–342.
30. Azevedo ZM, Luz RA, Victal SH, Kurdian B, Fonseca VM, Fitting C, et al. Increased production of tumor necrosis factor-alpha in whole blood cultures from children with primary malnutrition. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 171–183, doi: 10.1590/S0100-879X2005000200005.
31. Dewan P, Kaur IR, Faridi MM, Agarwal KN. Cytokine response to dietary rehabilitation with curd (Indian dahi) & leaf protein concentrate in malnourished children. *Indian J Med Res* 2009; 130: 31–36.
32. Feillet F, Parra HJ, Kamian K, Bard JM, Fruchart JC, Vidalhet M. Lipoprotein metabolism in marasmic children of northern Mauritania. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 484–488, doi: 10.1093/ajcn/58.4.484.
33. Mao J, Liu W, Wang Y. Apolipoprotein A-I expression suppresses COX-2 expression by reducing reactive oxygen species in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 454: 359–363, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.094.
34. Shavva VS, Mogilenko DA, Bogomolova AM, Nikitin AA, Dizhe EB, Efremov AM, et al. PPARgamma represses apolipoprotein A-I gene but impedes TNFalpha-mediated ApoA-I downregulation in HepG2 cells. *J Cell Biochem* 2016; 117: 2010–2022, doi: 10.1002/jcb.25498.
35. Kim KD, Lim HY, Lee HG, Yoon DY, Choe YK, Choi I, et al. Apolipoprotein A-I induces IL-10 and PGE2 production in human monocytes and inhibits dendritic cell differentiation and maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 1126–1136, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.10.065.
36. Lamri MY, Meghelli-Bouchenak M, Boualga A, Belleville J, Prost J. Time course of changes in rat serum lecithin-cholesterol acyl-transferase activity and high-density-lipoprotein composition during the consumption of two different low-protein diets followed by a balanced diet. *Nutrition* 1995; 11: 444–449.
37. Anatskaya OV, Sidorenko NV, Vinogradov AE, Beyer TV. Impact of neonatal cryptosporidial gastroenteritis on epigenetic programming of rat hepatocytes. *Cell Biol Int* 2007; 31: 420–427, doi: 10.1016/j.cellbi.2007.01.028.
38. Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real JM. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. *Clin Nutr* 2005; 24: 16–31, doi: 10.1016/j.clnu.2004.08.004.



Contents lists available at ScienceDirect

Annals of Hepatology

journal homepage: www.elsevier.es/annalsofhepatology

Concise review

Impact of apolipoprotein E genetic polymorphisms on liver disease: An essential review

José C.R. Nascimento^{a,b}, Gabriella A. Matos^a, Lianna C. Pereira^a, Anderson E.C.C.B. Mourão^b, Aline M. Sampaio^b, Reinaldo B. Oriá^{b,*}, Pierluigi Toniutto^c

^a Laboratory of Biology of Tissue Healing, Ontogeny and Nutrition, Department of Morphology and Institute of Biomedicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^b Department of Anesthesia and Liver Transplantation, Fortaleza General Hospital, Fortaleza, CE, Brazil

^c Hepatology and Liver Transplantation Unit, Department of Medical Area (DAME) Academic Hospital, University of Udine, Italy

ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 February 2019
Accepted 24 July 2019
Available online 11 September 2019

Keywords:
Apolipoprotein E
Polymorphisms
Liver cirrhosis
Liver diseases
Liver transplantation

ABSTRACT

Cirrhosis is an advanced stage of liver disease, compromising liver function with systemic health implications and poor quality of life. Hepatitis C virus (HCV) infection and alcoholic liver disease are the main causes of this pathology. However, since genetic factors may play a large role in the progression and severity of liver disease, and as apolipoprotein E (apoE) has been recognised to be mainly synthesised in the liver, apoE polymorphism studies are important to better understand the causal mechanisms in liver diseases. In this review, we summarise up-to-date studies addressing how apoE polymorphisms influence liver cirrhosis and liver transplantation outcomes and potential protective mechanisms. Although more clinical studies are needed to support these findings, the apoE ε4 allele seems to be protective against the progression of liver cirrhosis in the majority of aetiologies and the postoperative serum apoE phenotype of the transplanted subject receptors was converted to that of the donor, indicating that >90% of apoE in plasma is synthesised in the hepatic system.

© 2019 Fundación Clínica Médica Sur, A.C. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Cirrhosis is the result of the advanced stage of liver disease, resulting from the replacement of the functional liver architecture with non-functional fibrotic tissue, being responsible for important health problems worldwide [1,2]. Infections by hepatitis C virus (HCV) and alcoholic liver disease are the main causes of liver cirrhosis [3,4]. However, this liver pathology can also be caused by other aetiologies such as metabolic diseases, hereditary (hemochromatosis, Wilson's disease, Alpha-1-antitrypsin deficiency), non-alcoholic steatohepatitis (NASH), autoimmune hepatitis, Budd-Chiari syndrome, primary biliary cirrhosis (PBC), and primary sclerosing cholangitis [1,2]. Therapeutic options include liver transplantation, which is the definitive treatment in patients with end-stage liver cirrhosis, improving the quality of life as well as the longevity of this population [1].

Human apolipoprotein E (apoE) consists of a 34 kDa glycoprotein, containing 299 amino acid residues, which is an important protein component of very low density lipoproteins (VLDL) and a ligand for the low density lipoprotein receptor (LDL-R) [5–7].

ApoE is synthesised mainly in the liver, but also in the spleen, brain, kidney, lungs, adrenal gland, monocyte-macrophage, muscle tissues, central and peripheral nervous system. It has important actions in neuronal repair, in the regulation of lipid homeostasis, and in the transport and metabolism of triglycerides and cholesterol. It also has anti-inflammatory functions, skewing the pro-inflammatory macrophagic phenotype M1 to the anti-inflammatory M2 and decreasing the synthesis of interleukin-2 (IL-2), as well as roles in immunomodulatory activities such as the activation and proliferation of T lymphocytes [7–10].

Some studies have documented the association between apoE isoforms and diseases such as Alzheimer's disease, atherosclerosis, liver disease caused by HCV, human immunodeficiency virus (HIV) infection, HIV-associated dementia, pulmonary tuberculosis, childhood diarrhoea and herpes simplex virus infection [5,7,11,12].

ApoE was also evidenced in an experimental model as a sensitive marker in the graft function of transplanted hepatocytes, which is important since hepatocyte transplantation has been

* Corresponding author at: Institute of Biomedicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo, 1315 – Rodolfo Teófilo, 60430-270 Fortaleza, Ceará, Brazil.

E-mail addresses: oria@ufc.br, reinaldo70.oria@gmail.com (R.B. Oriá).

<https://doi.org/10.1016/j.aohp.2019.07.011>

1665-2681/© 2019 Fundación Clínica Médica Sur, A.C. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

emphasised as a promising treatment for patients with liver or metabolic diseases and acute liver failure [13].

It is well documented that genetic factors play a key role in the severity and progression of liver diseases. Therefore, we set out to review the role of apoE polymorphisms in conditioning the natural history of pre- and post-transplant liver disease, as well as its association with the development of liver fibrosis and response to therapies.

2. Polymorphism and different apolipoprotein e isoforms

The human apoE gene is polymorphic. In humans, this polymorphism is responsible for different apoE isoforms, due to amino acid substitutions at position 112 and 158 [5,14,15]. There are three common alleles of the apoE gene, which is located on chromosome 19 (19q13); these are called $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$, with six possible genotypes: $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, and $\epsilon 4/\epsilon 4$. The $\epsilon 3$ allele is the most frequent isoform, accounting for 70–80% of alleles worldwide, encoding the apoE3 isoform with a cysteine residue at position 112 and an arginine residue at position 158. The $\epsilon 4$ allele encodes the apoE4 isoform, with an arginine residue at both positions 112 and 158, whereas the $\epsilon 2$ allele has a point mutation causing the replacement of arginine for cysteine at position 158. These account for 10–15% (for the $\epsilon 4$ allele) and 5–10% (for the $\epsilon 2$ allele) of the alleles worldwide [5,7,9].

Previous studies have shown that the apoE $\epsilon 4$ allele may increase plasma triglyceride levels and decrease the levels of high density lipoprotein (HDL) cholesterol. In addition, it is associated with higher low density lipoprotein (LDL) cholesterol levels compared to the $\epsilon 3$ isoform. However, the $\epsilon 2$ isoform has a close association with hypertriglyceridaemia and hypocholesterolaemia [16]. Noteworthy, ~15% of $\epsilon 2/\epsilon 2$ homozygous patients may develop familial dysbetalipoproteinaemia (also known as type III hyperlipoproteinaemia). This leads to hypercholesterolaemia and hypertriglyceridaemia and may be associated with obesity and insulin resistance [17,18].

3. Apolipoprotein E and orthotopic liver transplantation

Orthotopic liver transplantation is currently the most appropriate treatment for end stage liver disease, and may also influence the synthesis and degradation of genetically polymorphic-encoded plasma proteins. Thus, as apoE is a polymorphic protein in humans, some studies have already reported that it is possible to detect and quantify changes in this protein in patients who have undergone liver transplantation [9,15].

Linton et al. [15] performed a 29-patient sample study and reported that the postoperative serum apoE phenotype of the receptor was converted to that of the donor. This indicates that >90% of apoE in the plasma is synthesised in the hepatic system. On the other hand, there was no change in the apoE phenotype of cerebrospinal fluid (CSF) from the donor to the receptor phenotype after hepatic transplantation, indicating that most of the apoE in CSF is synthesised locally and not derived from plasma. Kraft et al. [9] also emphasised that more than 90% of apoE in humans is of hepatic origin, since the new apoE phenotype following liver transplantation corresponded to that of the donor organ.

In experimental models, serum apoE is a sensitive marker with which to monitor the functioning and survival of grafts of transplanted hepatocytes. These results are of significant importance, since hepatocyte transplantation may be a promising technique for patients with metabolic liver disease or acute liver failure [13]. In addition, by affecting lipoprotein metabolism, apoE polymorphisms may modulate the recurrence of HCV in individuals undergoing liver transplantation [19].

4. Apolipoprotein E, hepatitis B and C viruses and hepatocellular carcinoma

4.1. Hepatitis B virus

Hepatitis B virus (HBV) infection is still very common (and worrying) in developing countries. Its aetiological agent is a DNA virus, hepatovirus of the family *Hepadnaviridae*; in particular, the long-standing infection can lead to liver failure, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) [20–22].

Previous studies have documented the association between apoE genotypes and viral diseases, including herpes simplex virus (HSV), HIV, HCV, and HBV [21,23,24]. It has been documented that the $\epsilon 3$ allele of the apoE was frequent in patients with progressive HBV-related liver cirrhosis [25].

In addition, Shen et al. [21] enrolled 40 healthy volunteers and 199 patients with HBV, active hepatitis, severe hepatitis, cirrhosis and HCC, and demonstrated that serum levels of apoE $\epsilon 3$ progressively increased with disease severity (HBV carriers developed hepatitis, followed by cirrhosis and then ultimately HCC). The $\epsilon 3$ allele and $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype were the most prevalent in all subgroups. Furthermore, progressive serum elevation of interleukin-6 (IL-6) and a gradual decrease of IL-2 were associated with disease progression and severity, while apoE serum levels were positively correlated with serum IL-6 (but not with IL-2).

4.2. Hepatitis C virus

The hepatitis C virus is a flavivirus and hepatotropic RNA virus, which can cause acute and chronic hepatitis C, as well as liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in humans [26]. However, there is a recent suggestion of a correlation between low cholesterol levels and infection by viruses C. Authors have reported that the mechanisms of HCV, HSV and HIV infection resemble each other, as all of these viruses compete with apoE to bind to cell receptors [23,27].

ApoE polymorphisms may be an important tool for monitoring the progression of fibrosis in patients with hepatitis C and normal alanine aminotransferase levels, as there may be competition mechanisms for viral entry and replication [27]. In other reports, HCV synthesised in individuals carriers of the apoE $\epsilon 2$ allele is associated with a low risk of infection and rapid elimination [28].

Pioneering studies by Wozniak et al. [24] have shown that the apoE $\epsilon 4$ allele was significantly more frequent in patients with chronic hepatitis C and mild liver disease compared to those with severe disease, indicating that the $\epsilon 4$ allele may be protective against liver injury due to HCV. Mueller et al. [29] also showed a significant low frequency of the apoE $\epsilon 4$ allele in patients diagnosed with chronic HCV infection, suggesting a protective action of this allele.

In the study by Price et al. [30] a significant lower frequency of both the $\epsilon 2$ and $\epsilon 4$ alleles was associated with a reduced infection risk in patients with HCV. Mueller et al. [31] also suggested a protective role of the $\epsilon 4$ allele and a higher risk of persistent HCV infection in $\epsilon 3$ allele carriers in chronically HCV-infected patients. Furthermore, a higher frequency of the $\epsilon 4$ allele was found among the non-cirrhotic chronic hepatitis C patients, supporting that the $\epsilon 4$ allele is protective against HCV infection [32]. In another study with 996 chronically HCV-infected patients, the apoE $\epsilon 4$ allele was poorly represented [31]. In addition, the same authors documented reduced viral loads in patients with the apoE $\epsilon 4$ allele who were chronically infected with HCV genotype type 1 [29], suggesting that this allele has a protective effect against HCV infection.

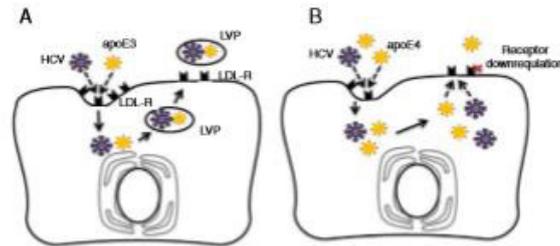


Fig. 1. Comparison of apolipoprotein E3 (apoE3) and apolipoprotein E4 (apoE4) effects on hepatitis C virus (HCV) infection in hepatocytes. (A) Normal cycle of HCV entry in hepatocytes via low density lipoprotein receptor (LDL-R). HCV competes with apoE particles (apoE3 in this case) for binding of LDL-R, ending in the formation of lipoviral-particle (LVP), which is important for virus infectivity. (B) ApoE4 proposed protection against HCV entry. In addition of apoE and virus competition for cell entry via LDL-R, the apoE4 carriers would show down-regulated LDL-receptors in hepatocytes and less viral capsulating.

4.3. Potential mechanisms for apoE4 protection against hepatitis C virus infection

As discussed previously in our review, apoE4 has been suggested as a protective factor against HCV infection [33,34]. The entry of HCV into human hepatocytes is a multistep mechanism in which various host factors are involved, including LDL-R and heparan sulphate proteoglycans (HSPGs). The lipoviral particle (LVP), which is important for viral infectivity, initially binds LDL-R and HSPGs through apoE [35–37]. It has been recognised that the LDL-R is down-regulated in apoE4 carriers [23]. Thus, in apoE4 patients, the virus entry in hepatocytes may be reduced [10]. Fig. 1 depicts the potential protective mechanism of apoE4 against HCV in hepatocytes.

ApoE would be the only specific factor for the production of infectious HCV particles; therefore, apoE could influence a late stage of virus infectivity after viral capsid envelopment, being essential for viral cell-to-cell transmission [38]. One hypothesis is that apoE4 indirectly affects LDL receptor expression by increasing the binding and internalisation of lipoproteins by apoE4 [31,39]. On the other hand, apoE4-induced hyperbeta-lipoproteinemia could directly interfere with uptake of the LDL-R-mediated virus due to forced competition between free beta-lipoproteins and virus-lipoprotein particles for local LDL receptors [40]. Thus, the apoE4-related functional properties in lipid metabolism (and negative regulation of liver LDL receptors) may provide an explanation (corroborated with epidemiological evidence) of how apoE4 carriers are protected against HCV infection.

4.4. Hepatocellular carcinoma

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most frequent primary liver cancer [41], and is mostly found in patients with liver cirrhosis, mainly due to infection by the hepatitis B and C viruses. Thus, as cirrhosis is the main risk factor associated with HCC, liver transplantation became the main treatment of this tumour [41–44].

Some studies have shown that apoE has antioxidant actions and is increased in malignant tumours such as gastric, prostate, ovarian and HCC, mainly due to the oxidative stress generated by the tumour cells [45–47]. Yokoyama et al. [48] found that apoE levels in tumour tissues were significantly higher than in normal non-tumour tissues in 88% of patients, without any increase in the plasma, and that apoE may be a histological marker for HCC. They also showed that 72.7% of patients with HCC were $\epsilon 3/\epsilon 3$.

Ahn et al. [25] found that the apoE plasma level was significantly higher in the group of patients with hepatic cirrhosis and the HCC group. They also observed that the $\epsilon 3$ allele and the $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype were the most frequent in both groups and that $\epsilon 4$ allele was

the one that presented the lower probability of developing liver cirrhosis.

5. Apolipoprotein E and primary biliary cirrhosis

Primary biliary cirrhosis (PBC) is an autoimmune cholestatic liver disease due to inflammation of small intrahepatic biliary ducts, which can result in fibrosis and cirrhosis of the liver in some patients; liver transplantation is the last therapeutic approach [49–51]. ApoE polymorphisms can modify the severity of PBC, acting on intestinal absorption and the excretion of bile salts. The phenotype may have an influence on the pathogenesis of PBC and also act on the disease response during treatment [50,51].

Corpechot et al. [50] reported that the $\epsilon 3$ allele and the $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype were the most frequent in PBC patients; however, there was no difference in both the disease and French control population, suggesting that $\epsilon 3$ is not a risk factor for the onset of PBC in the French population. Furthermore, after PBC treatment with ursodeoxycholic acid, among $\epsilon 4$ carriers, the liver enzymes did not return to baseline, suggesting a poor response to therapy in these patients. Conversely, in the study by Vuoristo et al. [51], the $\epsilon 2$ allele was seen significantly more often in patients with PBC, while the $\epsilon 4$ allele carriers showed better liver enzyme tests when treated with ursodeoxycholic acid. More studies with larger numbers are needed to better dissect these contradictory results.

6. Apolipoprotein E and alcoholic liver cirrhosis

Alcoholic liver cirrhosis due to chronic alcohol abuse has been a longstanding worldwide health problem, resulting in worrisome increasing in morbidity and mortality [52]. The incidence of the risk of death is higher in cirrhotic patients than the risk of developing liver cirrhosis, which indicates that low or moderate alcohol consumption is not related to significant increases in the risk of developing cirrhosis; however, this risk tends to increase exponentially from excessive alcohol intake [53]. In addition, not every individual who consumes alcohol regularly will develop alcoholic cirrhosis, as genetic and environmental factors also contribute to the development of this condition. However, it is important to emphasise that alcohol has an important effect on lipid metabolism, leading to hypertriglyceridaemia, hypercholesterolaemia and changes in lipoproteins [54,55].

However, previous studies have documented the influence of apoE polymorphisms in patients who developed hepatic cirrhosis due to alcohol [23,55]. In an experimental model, the authors observed that chronic long-term ingestion of ethanol in hepatic alcohol dehydrogenase-deficient deer mice led to the infiltration of T lymphocytes into the liver and hepatic steatosis. There was also

Table 1
ApoE polymorphism studies on liver cirrhosis in humans.

References	Aetiology	Studies characteristics	Outcomes	Allele frequencies
Mueller et al. 2009 [4]	HCV	701 patients with chronic HCV infection, 523 healthy controls and 283 non-HCV patients.	Risk of chronic HCV infection.	↓ e4
Wozniak et al. 2002 [24]	HCV	156 anti-HCV positive patients and 104 non-HCV infected.	Risk of severe disease.	↓ e4
Fabris et al. 2011 [27]	HCV	128 Caucasians, PNALT and HCV carriers. A subgroup of 116 patients with absent or minimal fibrosis was follow up for 10 years.	Rapid progression of fibrosis.	↑ e3/e3 ↓ e2/e2 – e4/e4
Mueller et al. 2003 [29]	HCV	Retrospective analysis, treatment response of 506 chronically HCV infected patients.	Reduced HCV virus genotype 1.	↑ e4
Price et al. 2006 [30]	HCV	420 Northern European patients with evidence of exposure to HCV were compared with 288 healthy controls.	Risk of HCV infection.	↓ e2 – e4 ↓ e2/e2
Mueller et al. 2016 [31]	HCV	701 patients with chronic HCV infection and 295 additional patients with chronic HCV infection, 179 patients with a history of spontaneous HCV clearance; 283 patients with non-HCV-associated chronic liver disease and 2234 healthy controls.	HCV infection: Protective risk	↑ e4 ↑ e3
Teama et al. 2016 [32]	HCV	Case-control study: 80 chronic hepatitis C patients (40 cirrhotic and 40 non cirrhotic), and 40 healthy controls.	Risk of severe disease.	↓ e4
Shen et al. 2015 [21]	HCC and HBV	40 healthy volunteers and 199 patients (30 HBV carriers, 60 with active hepatitis, 12 with severe hepatitis, 58 with HBV and liver cirrhosis, and 39 with HCC).	Progressive with disease severity.	↑ e3, ↑ e3/e3 ↓ e2, ↓ e2/e4
Ahn et al. 2012 [25]	HCC and HBV	Case-control study: 47 healthy controls, 156 patients (50 with HBV and liver cirrhosis, and 59 with HCC and liver cirrhosis).	Risk of developing liver cirrhosis.	↑ e3, ↑ e3/e3 ↓ e4, ↓ e4/e4
Yokoyama et al. 2006 [48]	HCC	17 patients (14 HCV carriers and 3 HBV carriers).	Production in HCC tissues.	↑ e3
Corpechot et al. 2001 [50]	PBC	Retrospective cohort: 72 PBC patients were treatment for 4 years with ursodeoxycholic acid (12–15 mg/kg/day) and thereafter compared with 1808 healthy French controls.	No susceptibility to PBC. Risk of severe disease and poor response to treatment.	e2 – e3 – e4 ↑ e4
Vuoristo et al. 1997 [51]	PBC	88 patients with PBC were randomised to ursodeoxycholic acid, placebo treatment or colchicine for 2 years.	PBC severity. Expression of PBC and response to treatment.	e2 – e3 – e4 ↑ e2, ↓ e4
Iron et al. 1994 [54]	ALC	35 Caucasian cirrhotic patients compared with European Caucasian populations. The results show lower e4 and e2 allele frequencies and higher e3 allele frequency in Caucasian alcoholic cirrhotics	Risk of alcoholic cirrhosis.	↑ e3 ↓ e4 – e2
Hernández-Nazara et al. 2008 [55]	ALC	Case-control study: 86 patients with alcoholic cirrhosis were subdivided in hyperlipidemic and non-hyperlipidemic, and 133 healthy individuals.	Risk of liver cirrhosis: Hyperlipidemic. Non-hyperlipidemic.	↑ e2 ↑ e4
Frenzer et al. 2002 [57]	ALC	Case-control study: Caucasian adults (57 with alcoholic cirrhosis, 71 with alcoholic chronic pancreatitis, 57 with alcoholics without apparent organ damage and 200 healthy blood donors).	Risk of alcoholic cirrhosis.	↑ e3/e3 ↓ e4/e4
De feo et al. 2012 [63]	NAFLD	310 cases and 422 controls were genotyped for apoE.	NAFLD risk.	↑ e3 ↓ e4
Sazci et al. 2008 [64]	NASH	57 cases and 245 controls were genotyped for apoE.	NASH risk.	↑ e3, e3/e3 ↓ e4, e2/e3 and e3/e4
Demirag et al. 2007 [65]	NAFLD	237 NAFLD patients and 201 controls in Turkish population.	Protective against NAFLD.	↑ e2, e2/e3
Yang et al. 2005 [66]	NAFLD	Cross-sectional study: 711 patients with NAFLD and 711 control subjects.	NAFLD risk.	↑ e4
Stachowska et al. 2013 [67]	NAFLD	Prospective study: 23 patients with NAFLD, 11 patients in the apoE4 group were compared with 12 in the apoE3 group.	Risk of advanced fibrosis.	↑ e4 ↓ e3

Hepatitis C virus (HCV); Normal alanine aminotransferase levels (PNALT); Hepatocellular carcinoma (HCC); Hepatitis B virus (HBV); Primary biliary cirrhosis (PBC); Alcoholic liver cirrhosis (ALC); Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); Increased allele frequency (↑); Decrease allele frequency (↓); Apolipoprotein (apoE).

a reduction in the frequency of lipid-carrying proteins, resulting in a decrease in the frequency of apolipoproteins in plasma [56].

In the analysis of patients with hyperlipidaemic or non-hyperlipidaemic alcoholic liver cirrhosis, Hernández-Nazara et al. [55] observed that the e2 allele was closely associated with the hyperlipidaemic group and the early onset of cirrhosis, with alcohol intake <20 years, and that the allele e4 was more frequent in the non-hyperlipidaemic group and apoE e4 carriers were more

resistant to cirrhosis with alcohol consumption >20 years. Iron et al. [54] studied alcoholic cirrhotic patients and observed that there was a higher frequency of e4 and e2 alleles. Frenzer et al. [57] did not identify a significant difference in apoE genotype frequencies when compared to alcoholic cirrhosis, pancreatitis, controls and blood donor groups. Furthermore, in the cirrhotic group, the e3/e3 genotype had a higher frequency, whereas e4/e4 was the least frequent.

7. Non-alcoholic fatty liver disease or non-alcoholic steatohepatitis

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterised as the accumulation of excess liver fat and increased endogenous lipogenesis substances unrelated to chronic alcoholism [58,59]. Most of these patients may present with metabolic alterations such as dyslipidaemia, diabetes mellitus and obesity. In addition, they may develop non-alcoholic steatohepatitis (NASH), which may progress to fibrosis and cirrhosis [58,60]. ApoE is associated with different pathologies as well as with altered lipid profiles [61]. Previous studies with apoE deficient mice fed a cholesterol-rich diet have shown that this method may be a valuable alternative in NASH research [62]. Interestingly, $\epsilon 4$ allele patients had a significantly lower risk of NAFLD and a significant reduction in HDL cholesterol [63].

In another study, the $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype and $\epsilon 3$ allele were more prevalent in patients with NAFLD and also associated with increased risk of NASH, whereas the $\epsilon 2/\epsilon 3$ and $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotypes and allele $\epsilon 4$ were associated with protection against NASH [64]. In addition, the $\epsilon 2$ allele and $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotype have been shown protective against the development of NAFLD [65]. Conversely, other studies suggest that the apoE $\epsilon 4$ allele is a risk factor for NAFLD pathogenesis [66].

8. Role of apolipoprotein E in liver fibrosis

A protective effect of apoE $\epsilon 4$ against severe hepatic fibrosis has been supported by previous findings of lower $\epsilon 4$ allele frequency among patients with HCV-related severe hepatic fibrosis compared to those with mild liver disease [24]. Fabris et al. have reported a benefit of the apoE $\epsilon 4$ allele on the progression of fibrosis in liver transplant patients with recurrent hepatitis C [19]. However, in another study by Stachowska et al. [67] evaluating NAFLD, the $\epsilon 4$ allele was significantly associated with the development of advanced fibrosis due to disrupted hepatic fatty acid metabolism and increased 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid production [66]. In addition, a study by Mueller et al. could not find an $\epsilon 4$ allele-protective effect against liver fibrosis in patients diagnosed with chronic HCV infection [29]. Nonetheless, the $\epsilon 3/\epsilon 3$ occurrence has been correlated with the rapid progression of fibrosis [27].

ApoE can facilitate cholesterol efflux from peripheral macrophages and other cells to form nascent discoidal high-density lipoprotein (HDL) after interaction with ABC transporters. The HDL particles deliver the cholesterol to hepatocytes via interaction with scavenger receptor B1 (SR-B1) or low-density lipoprotein (LDL) receptors. There is later conversion to cholesterol-bearing bile acids, therefore contributing to the reverse cholesterol transport from periphery to hepatocytes and to faecal excretion [68].

Hepatocytes can become steatotic by prolonged high-fat diets, indicating that hepatocytes may be overloaded by excess cholesterol delivery. Increased lipolysis (decreased β -oxidation of triglycerides) or increased de novo lipogenesis and reduced VLDL secretion from hepatocytes are also involved in this process [69]. ApoE has been recognised as an important contributing factor to improving liver steatosis. It has been shown that apoE-deficient mice chronically fed with western diets develop non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis [62].

Chronic liver inflammation and liver steatosis may increase the rates of hepatocyte apoptosis and significantly increase the expression of platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) and transforming growth factor β (TGF β) that lead to activation of Ito cells (hepatic stellate cells) and pro-fibrogenesis-activated genes [70]. Ito cells, which represent quiescent liver vitamin A-storing

cells in the physiological state, are activated during chronic liver inflammation. These cells are transdifferentiated to myofibroblasts that produce extracellular matrix collagens and a myriad of inflammatory signals that lead to liver fibrosis and loss of vitamin A storage [71]. Interestingly, cultured Ito cells are able to synthesise and release apoE peptides [72].

It remains elusive whether apoE $\epsilon 4$ could be released during fibrosis and whether this peptide could improve this process.

Table 1 summarises studies addressing apoE polymorphisms and liver diseases in clinical studies to date.

9. Conclusion

Overall, this concise review has summarised accumulating evidence that apoE $\epsilon 4$ carriers are protected against chronic HCV infection, have slow progression of liver fibrosis, and are less likely to have alcoholic cirrhosis, NASH, HCC or HBV. On the other hand, apoE $\epsilon 3$ carriers are at higher risk for developing liver cirrhosis caused by NASH, NAFLD, HCC or HBV. We still can find contradictory results regarding the protective role of apoE $\epsilon 4$ on liver fibrosis and NAFLD. In addition, a gap of knowledge still exists regarding the apoE genotypes' role on the mechanisms of liver injury following viral hepatitis. Interactional mechanisms of apoE with hepatitis viruses may be a potential target for gene-related therapies in the future.

Although further clinical studies are highly needed, in this essential review, we highlight that carriage of the apoE $\epsilon 4$ allele may exert a protective effect in reducing the progression of most liver diseases from different aetiologies.

Abbreviations

HCV	hepatitis C virus
ApoE	apolipoprotein E
NASH	non-alcoholic steatohepatitis
PBC	primary biliary cirrhosis
VLDL	very low density lipoprotein
LDL-R	low density lipoprotein receptor
IL-2	interleukin-2
HIV	human immunodeficiency virus
HDL	high density lipoprotein
LDL	low density lipoprotein
CSF	cerebrospinal fluid
HBV	hepatitis B virus
HCC	hepatocellular carcinoma
HSV	herpes simplex virus
IL-6	interleukin-6
HSPGs	heparan sulfate proteoglycans
LVP	lipoviral particle
PBC	primary biliary cirrhosis
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
SR-B1	scavenger receptor-B1
PDGF-BB	platelet-derived growth factor-BB
TGF β	transforming growth factor β

Contribution of authors

J.C.R.N., G.A.M., A.E.C.C.B.M., L.C.P., A.M.S., R.B.O., P.T. contributed to the study design and writing of the manuscript; J.C.R.N., R.B.O., P.T. critically revised the manuscript for important intellectual content and supervised the study.

Financial support

The study was funded in part by the Brazilian funding agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- Iredale JP. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *BMJ* 2003;327:143–7.
- Martinez-Esparza M, Tristan-Manzano M, Ruiz-Alcaraz AJ, Garcia-Penarrubia P. Inflammatory status in human hepatic cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2015;21:11522–41.
- Mas VR, Fassnacht R, Archer KJ, Mahaf D. Molecular mechanisms involved in the interaction effects of alcohol and hepatitis C virus in liver cirrhosis. *Mol Med* 2010;16:287–97.
- Mueller S, Millonig G, Setz HK. Alcoholic liver disease and hepatitis C: a frequently underestimated combination. *World J Gastroenterol* 2009;15:3462–71.
- Zannis VI, Breslow JL, Utermann G, Mahley RW, Weisgraber KH, Havel RJ, et al. Proposed nomenclature of apoE isoforms, apoE genotypes, and phenotypes. *J Lipid Res* 1982;23:911–4.
- Mahley RW, Huang Y, Rall Jr SC. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia), questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res* 1999;40:1933–49.
- Mahley RW, Rall Jr SC. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;1:507–37.
- Driscoll DM, Getz GS. Extrahepatic synthesis of apolipoprotein E. *J Lipid Res* 1984;25:1368–79.
- Kraft HG, Menzel HJ, Hoppichler F, Vogel W, Utermann G. Changes of genetic apolipoprotein phenotypes caused by liver transplantation. *J Clin Invest* 1989;83:137–42.
- Tudorache I, Trauca VG, Gafencu AV. Apolipoprotein E – a multifunctional protein with implications in various pathologies as a result of its structural features. *Comput Struct Biotechnol J* 2017;15:359–65.
- Schmitz F, Meviusen V, Krantz C, Kimmel M, Erdmann J, Hoffmann R, et al. Robust association of the APOE epsilon4 allele with premature myocardial infarction especially in patients without hypercholesterolemia: the Aachen study. *Eur J Clin Invest* 2007;37:106–8.
- Oria RB, Patrick PD, Blackman JA, Lima AA, Guerrant RL. Role of apolipoprotein E4 in protecting children against early childhood diarrhea outcomes and implications for later development. *Med Hypotheses* 2007;68:1099–107.
- Jorns C, Takahashi T, Callaghan E, Zemack H, Larsson L, Nowak G, et al. Serum apolipoprotein E as a marker to monitor graft function after hepatocyte transplantation in a clinically relevant mouse model. *Transplant Proc* 2013;45:1780–6.
- Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W. Genetics of the apolipoprotein E system in man. *Am J Hum Genet* 1980;32:339–47.
- Linton MF, Gish R, Hubl ST, Bittler E, Esquivel C, Bry WL, et al. Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation. *J Clin Invest* 1991;88:270–81.
- Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2002;155:487–95.
- Koopal C, Marais AD, Westerink J, Vissereen FL. Autosomal dominant familial dysbetalipoproteinemia: a pathophysiological framework and practical approach to diagnosis and therapy. *J Clin Lipidol* 2017;11:12–23.
- Schneider WJ, Kovanen PT, Brown MS, Goldstein JL, Utermann G, Weber W, et al. Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apolipoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits, and cows. *J Clin Invest* 1981;68:1075–85.
- Fabris C, Toniutto P, Bietto D, Minisini R, Smerio C, Caldato M, et al. Low fibrosis progression of recurrent hepatitis C in apolipoprotein E epsilon4 carriers: relationship with the blood lipid profile. *Liver Int* 2005;25:1128–35.
- Yin Z, Xiong C, Wang Y, Zhou X, Yan SK. Investigation of the relationship between apolipoprotein E gene polymorphisms and hepatitis B virus infection in northern China. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1803–7.
- Shen Y, Li M, Ye X, Bi Q. Association of apolipoprotein E with the progression of hepatitis B virus-related liver disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:14749–56.
- Franco E, Bagnato B, Marino MG, Meleleo C, Serino L, Zaratti L, et al. Epidemiology and prevention in developing countries. *World J Hepatol* 2012;4:74–80.
- Kuhlmann I, Minihane AM, Huebner P, Nebel A, Rimbach G. Apolipoprotein E genotype and hepatitis C, HIV and herpes simplex disease risk: a literature review. *Lipids Health Dis* 2010;9:8.
- Wozniak MA, Itzhaki RF, Faragher EB, James MW, Ryder SD, Irving WL. Apolipoprotein E-epsilon 4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus. *Hepatology* 2002;36:456–63.
- Ahn SJ, Kim DK, Kim SS, Bae CB, Cho HJ, Kim HG, et al. Association between apolipoprotein E genotype, chronic liver disease, and hepatitis B virus. *Clin Med Hepatol* 2012;18:295–301.
- 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;244:359–62.
- Fabris C, Vandellic C, Toniutto P, Minisini R, Colletta C, Falletti E, et al. Apolipoprotein E genotypes modulate fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and persistently normal transaminases. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:328–33.
- Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, et al. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol* 2010;84:12048–57.
- Mueller T, Geisler R, Sarrazin C, Graf C, Halangk J, Witt H, et al. Apolipoprotein E4 allele is associated with poor treatment response in hepatitis C virus (HCV) genotype 1. *Hepatology* 2003;38:1592–3.
- Price DA, Bassendine MF, Norris SM, Golding C, Teas GL, Schmid ML, et al. Apolipoprotein epsilon3 allele is associated with persistent hepatitis C virus infection. *Gut* 2006;55:715–8.
- Mueller T, Fischer J, Geisler R, Rosendahl J, Böhm S, van Bömmel F, et al. Apolipoprotein E allele frequencies in chronic and self-limited hepatitis C suggest a protective effect of APOE4 in the course of hepatitis C virus infection. *Liver Int* 2016;36:1267–74.
- Teama SHH, Agwa S, Makhlof M, Nashaat E, Sayed M, Younsy W, et al. Apolipoprotein-E gene polymorphism and possible role of ApoE-ε4 allele with a lower probability of progression to HCV-related liver cirrhosis in Egyptian patients. *Merit Res J Med Med Sci* 2016;4:440–7.
- Wozniak MA, Lugo Iparraquirre LM, Dirks M, Deb-Chatterji M, Pflugrad H, Goldbecker A, et al. Apolipoprotein E-epsilon4 deficiency and cognitive function in hepatitis C virus-infected patients. *J Virol Hepat* 2016;23:39–46.
- Weller R, Hueging K, Brown RJP, Todd D, Joecks S, Vondran FWR, et al. Hepatitis C virus strain-dependent usage of apolipoprotein E modulates assembly efficiency and specific infectivity of secreted virions. *J Virol* 2017;91:e00422–e517.
- Popescu CI, Dubuisson J. Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol Cell* 2009;102:63–74.
- André P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 2002;76:6919–28.
- Felber DJ, Hafirassou MI, Lefevre M, Baumert TF, Schuster C. Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins – impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. *Viruses* 2013;5:1292–324.
- Hueging K, Doepke M, Vieytes G, Blankwitz D, Frestenzer A, Doerrbecker J, et al. Apolipoprotein E co-determines tissue tropism of hepatitis C virus and is crucial for viral cell-to-cell transmission by contributing to a post-replication step of assembly. *J Virol* 2014;88:1433–46.
- Yang Z, Wang X, Chi X, Zhao F, Guo J, Ma P, et al. Neglected but important role of apolipoprotein E exchange in hepatitis C virus infection. *J Virol* 2016;90:9632–43.
- Monazahian M, Böhm E, Bonk S, Koch A, Scholz C, Grette S, et al. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* 1999;57:223–9.
- Tinkle CL, Haas-Kogan D. Hepatocellular carcinoma: natural history, current management, and emerging tools. *Biologies* 2012;6:207–19.
- Brutsi J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011;53:1020–2.
- Mazzafarro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996;334:693–9.
- Jensen PR, Serra SC, Mitragoli I, Karlsson M, Cabella C, Poggi L, et al. Hyperpolarized [1,3-13C]ethyl acetoacetate is a novel diagnostic metabolic marker of liver cancer. *Int J Cancer* 2015;136:E117–26.
- Oue N, Hamai Y, Mitani Y, Matsumura S, Oshimo Y, Aung PP, et al. Gene expression profile of gastric carcinoma: identification of genes and tags potentially involved in invasion, metastasis, and carcinogenesis by serial analysis of gene expression. *Cancer Res* 2004;64:2397–405.
- Chen YC, Pohl C, Wang TL, Morin FJ, Risberg B, Kristensen GR, et al. Apolipoprotein E is required for cell proliferation and survival in ovarian cancer. *Cancer Res* 2005;65:331–7.
- Liu DY, Peng ZH, Qiu GQ, Zhou CZ. Expression of telomerase activity and oxidative stress in human hepatocellular carcinoma with cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1859–62.
- Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, Iizuka N, Terai S, Oka M, et al. Protein level of apolipoprotein E increased in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2006;28:625–31.
- Hirschfield GM, Gerstwin ME. The immunobiology and pathophysiology of primary biliary cirrhosis. *Annu Rev Pathol* 2013;8:303–30.
- Corpechot C, Benlian P, Barbu V, Chazouilleres O, Poupon RE, Poupon R. Apolipoprotein E polymorphism, a marker of disease severity in primary biliary cirrhosis? *J Hepatol* 2001;35:324–8.
- Vuoristo M, Färkkilä M, Gylling H, Karvonen AL, Leino R, Lehtola J, et al. Expression and therapeutic response related to apolipoprotein E polymorphism in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1997;27:136–42.
- Kerr WC, Fillmore KM, Maruy P. Beverage-specific alcohol consumption and cirrhosis mortality in a group of English-speaking beer-drinking countries. *Addiction* 2000;95:339–46.
- Rehm J, Taylor B, Mohapatra S, Irving H, Baliunas D, Patra J, et al. Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Rev* 2010;29:437–45.

- [54] Iron A, Richard P, Pascual De ZM, Dumas F, Cassaigne A, Couzigou P. Genetic polymorphism of apolipoprotein E in Caucasian alcoholic cirrhotics. *Alcohol Alcohol* 1994;29:715–8.
- [55] Hernandez-Nazara ZH, Ruiz-Madrigal B, Martinez-Lopez E, Roman S, Panduro A. Association of the epsilon 2 allele of APOE gene to hypertriglyceridemia and to early-onset alcoholic cirrhosis. *Alcohol Clin Exp Res* 2008;32:559–66.
- [56] Bhopale KK, Amer SM, Kaphalia L, Soman KV, Wiktorowicz JE, Shakeel Ansari GA, et al. Proteomic profiling of liver and plasma in chronic ethanol feeding model of hepatic alcohol dehydrogenase-deficient deer mice alcohol. *Clin Exp Res* 2017;41:1675–85.
- [57] Frenzer A, Butler WJ, Norton ID, Wilson JS, Apte MV, Pirola RC, et al. Polymorphism in alcohol-metabolizing enzymes, glutathione S-transferases and apolipoprotein E and susceptibility to alcohol-induced cirrhosis and chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:177–82.
- [58] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Kinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2018;67:328–57.
- [59] Gentile CL, Pagliassotti MJ. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem* 2008;19:567–76.
- [60] Puri P, Baillie RA, West MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2007;46:1081–90.
- [61] Papaioannou I, Simons JP, Owen JS. Targeted in situ gene correction of dysfunctional APOE alleles to produce atheroprotective plasma ApoE3 protein. *Cardiol Res Pract* 2012;2012:148796.
- [62] Schierwagen R, Mayblich L, Zimmer S, Hittatiya K, Bäck C, Klein S, et al. Seven weeks of Western diet in apolipoprotein-E-deficient mice induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis. *Sci Rep* 2015;5:12931.
- [63] De Feo E, Cefalo C, Arzani D, Amore R, Landolfi R, Grieco A, et al. A case-control study on the effects of the apolipoprotein E genotypes in nonalcoholic fatty liver disease. *Mol Biol Rep* 2012;39:7381–8.
- [64] Sazci A, Akpinar G, Aygün C, Ergül E, Sentürk O, Hulagu S. Association of apolipoprotein E polymorphisms in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci* 2008;53:3218–24.
- [65] Demirag MD, Onen HI, Karagöz MY, Dogan I, Karakan T, Elmekci A, et al. Apolipoprotein E gene polymorphism in nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci* 2007;52:3399–403.
- [66] Yang MH, Son HJ, Sung JD, Choi YH, Koh KC, Yoo BC, et al. The relationship between apolipoprotein E polymorphism, lipoprotein(a) and fatty liver disease. *Hepatogastroenterology* 2005;52:1832–5.
- [67] Stachowska E, Maciejewska D, Ossowski P, Druzd A, Ryterska K, Banaszczak M, et al. Apolipoprotein E4 allele is associated with substantial changes in the plasma lipids and hyaluronic acid content in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Physiol Pharmacol* 2013;64:711–7.
- [68] Getz GS, Reardon CA. Apoprotein E and reverse cholesterol transport. *Int J Mol Sci* 2018;19, pii:E3479.
- [69] Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest* 2017;127:55–64.
- [70] Mekala S, Tulmili SV, Geesala R, Manupati K, Dhole NR, Das A. Cellular cross-talk mediated by platelet-derived growth factor βB and transforming growth factor β during hepatic injury activates hepatic stellate cells. *Can J Physiol Pharmacol* 2018;96:728–41.
- [71] Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Ann Gastroenterol Surg* 2017;1:52–9.
- [72] Ramadoss G, Rieder H, Theiss F, Meyer zum Büschenfelde KH. Fat-storing (Ito) cells of rat liver synthesize and secrete apolipoproteins: comparison with hepatocytes. *Gastroenterology* 1989;97:163–72.



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/archoralbio

Apolipoprotein E, periodontal disease and the risk for atherosclerosis: a review



L.C. Pereira^a, J.C.R. Nascimento^a, J.M.C. Rêgo^a, K.M. Canuto^a, M.E. Crespo-Lopez^d,
J.I. Alvarez-Leite^c, A. Baysan^b, R.B. Oriá^{a,*}

^aLaboratory of the Biology of Tissue Healing, Oncogeny and Nutrition, Department of Morphology and Institute of Biomedicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^bInstitute of Dentistry, Barts and the London, School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University, London, UK

^cInstitute of Biological Sciences, Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^dLaboratory of Molecular Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords

Apolipoprotein E
Periodontal disease
Oral microbiota
Inflammation
Atherosclerosis

ABSTRACT

The association between cardiovascular and periodontal diseases is characterized by chronic inflammatory processes, with a high prevalence worldwide and complex genetic-environment interactions. Although apolipoprotein E4 (ApoE4), one of the isoforms coded by a polymorphic APOE gene, has been widely recognized as a risk factor for cardiovascular diseases and as an immunoinflammatory factor, less is known regarding how ApoE4 affects atherosclerosis in periodontitis patients. The aim of this review was to investigate the potential underlying mechanisms related to APOE4 that could increase the risk of periodontal disease and, ultimately, of atherosclerosis. There have only been a few studies addressing apoE polymorphisms in patients with chronic periodontitis. To date, no studies have been performed that have assessed how ApoE4 affects atherosclerotic disease in chronic periodontitis patients. Although clinical studies are warranted, experimental studies have consistently documented the presence of periodontal pathogens, which are usually found in the oral cavity and saliva, in the atherosclerotic plaques of ApoE-deficient mice. In addition, in this review, the potential role of the APOE4 allele as an example of antagonistic pleiotropy during human evolution and its relation to oral health is discussed.

1. Introduction

Periodontal disease (PD) is a multifactorial, chronic, inflammatory disease, associated with bacterial plaque, gingival bleeding, edema and increased crevicular fluid formation that results from endotoxin bacteria-driven host immune responses. PD is characterized by the inflammation and destruction of tooth supporting connective tissues in response to subgingival infection by various periodontal pathogens (Kinane, Stathopoulou, & Papananou, 2017). Periodontitis pathophysiology is associated with a myriad of pro-inflammatory cytokines, skewed towards Th1/Th17 responses (de Vries, Andreotta, Loos, & Nicu, 2017) and induced osteolysis (Goncalves et al., 2014), the latter of which has been found to be reduced by simvastatin treatment (a cholesterol-lowering drug) (Dalcico et al., 2013).

Due to its chronic inflammatory etiology, a potential link between the occurrence of periodontal disease and atherosclerosis has been

investigated (Cardoso, Reis, & Manzanares-Cespedes, 2018). Pioneer studies from Mattila and colleagues have suggested associations between myocardial infarction and poor oral health, which could be facilitated by chronic low grade bacterial infections (such as dental caries and chronic periodontitis) (Mattila et al., 1989). However, the determination of a causative effect has been hampered because patients with chronic illnesses (including metabolic syndrome and diabetes) are also likely to be affected by periodontitis. However, in the studies reported by Mattila, poor oral health was a predictor of myocardial infarction, even after adjusting for age, social class, hypertension, serum lipid and lipoprotein concentrations, smoking, the presence of diabetes, and serum C peptide concentrations (Mattila et al., 1989).

The complications associated with atherosclerosis and metabolic syndrome are recognized as worrisome public health problems in developing countries and may especially affect populations with nutritional and immunoinflammatory disorders, with the likelihood of

* Corresponding author. Institute of Biomedicine and Department of Morphology, School of Medicine, Federal University of Ceará Rua Cel. Nunes de Melo, 1315-Rodolfo Teófilo, Fortaleza, 60430-270, Ceará, Brazil.

E-mail addresses: rbo5u@vtrgma.edu, oria@ufc.br (R.B. Oriá).

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.11.009>

Received 14 July 2018; Received in revised form 25 September 2018; Accepted 10 November 2018
0003-9969/ © 2018 Published by Elsevier Ltd.

increased fatalities (DeBoer et al., 2012; Teo & Dokainish, 2017). The systemic inflammatory processes (even those that are low-grade) induced by chronic periodontal disease (Cardoso et al., 2018) may be related to peripheral arterial (and endothelial) inflammatory conditions (Calapkorur, Alkan, Tasdemir, Akcali, & Saatci, 2017), which may further elevate the risks of atherosclerosis, coronary disease, myocardial infarction, and death.

Cardiovascular (CVD) and periodontal diseases share genetic bases of susceptibility and important behavioral components, such as diet, plaque control and smoking-related habits. Studies have shown that both conditions increase with age, lower socioeconomic strata and poor educational background, especially for males, the diabetic population, and individuals undergoing psychological stress or who have a significant genetic predisposition (Nazir, 2017).

Apolipoprotein E (ApoE – protein; APOE – gene) is a glycoprotein synthesized in the liver that plays a key role in the catabolism of triglycerides and cholesterol. In addition, ApoE plays a pivotal role in different inflammatory conditions (Azevedo et al., 2014, 2012). In animal models, an ApoE deficiency can lead to increased lipid levels in the bloodstream, even under chow diet conditions. In addition, APOE null mice have been extensively used as animal models for atherosclerosis, as these mice accumulate atheroma in the aortae when chronically fed with cholesterol-enriched diets (Getz & Reardon, 2016).

In this review, recent findings were discussed, highlighting how different ApoE isotypes may affect atherosclerosis in patients with periodontal disease, and discuss about the use of APOE knockout mice as tool for understanding how oral pathogens can be translocated and their effects on the atherosclerotic plaque. Finally, it was speculated that the APOE4 allele may play a potential role as an example of antagonistic pleiotropy during human evolution in relation to oral health. Antagonistic pleiotropy is an evolutionary theory (Gaillard & Lemaître, 2017) that postulates that certain genes or alleles may differentially impact fitness during the lifespan of an organism (Tuminello & Han, 2011).

2. Periodontal and cardiovascular diseases

Teeth are supported by a connective tissue attachment apparatus (periodontal ligament), which is partly inserted into the outer layer of the root surface (root cementum) and partly into the bone of the maxillary or mandibular alveolar processes, and, to a lesser extent, by the gingival tissues that surround the teeth (Cho & Garant, 2000).

In periodontal disease, inflammatory processes induced by microbes result in the formation of a periodontal pocket with the apical migration of both the gingival attachment to the root surface and the plaque biofilm, gingival recession and alveolar bone resorption (Hajishengallis & Sahingur, 2014).

According to the WHO, severe periodontal disease affects 15%–20% of the middle-aged global population (35–44 years of age) and may cause 5%–15% of total tooth loss. Approximately 50% of periodontal diseases have been attributed to genetic variance (Rajendra Santosh, Ogle, Williams, & Woodbine, 2017).

Atherosclerosis or atherosclerotic vascular disease is a chronic inflammatory process characterized by the progressive accumulation of atheroma plaques in the vessel endothelium, which originate from inflammatory responses and immune system activation (Nguyen, Kim, Quan, Nguyen, & Tran, 2015).

Oral infections may interfere with vascular, endothelial, and smooth muscle cell biology, which could cause predisposition to atherosclerosis (Chistiakov, Orckhov, & Bobryshev, 2016). Oral pathogen-related inflammation can promote pro-coagulant effects, followed by greater scavenger receptor (SR) A and CD36 expression and activity by macrophages. (Baer, Huang, & Gibson, 2009) The uptake of cholesterol-rich LDL was also related to the increased expression of cell-adhesion molecules (such as integrin CD49c ($\alpha 3$ -subunit) in monocytes) (Escate, Padro, & Badimon, 2016). In addition, smooth muscle cell proliferation,

migration and anti-apoptosis machinery can be upregulated after exposure to certain oral pathogens, such as *Porphyromonas gingivalis*, which are known to induce pro-inflammatory cytokines in periodontal tissues (Narusishi & Nagata, 2018; Teles & Wang, 2011). Furthermore, oral pathogens may exert pro-atherosclerotic effects by activating the uptake of oxidized LDL (LDLox) and the production of pro-inflammatory cytokines (such as TNF, IL-6 and IL-1 β) and transforming macrophages in "foam cells". The migration of other leukocyte subtypes (such as lymphocytes) contributes to the increased inflammatory status and leads to atherosclerotic plaque instability and rupture (Nguyen et al., 2015).

Chronic inflammatory processes driven by the periodontal biofilm may be facilitated by complex host-pathogen interactions (e.g., worsened by immunosuppression and pathogenic virulence). Multiple risk factors, such as age, CVD familial history, dyslipidemia, smoking, systemic arterial hypertension, sedentary lifestyle, diabetes mellitus and being overweight may debilitate the host and create an appropriate scenario for a pro-atherogenic effect that is spread by oral pathogens (Chistiakov et al., 2016; Lockhart et al., 2012).

The American Heart Association's Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease (1992) reviewed several risk factors and found a strong association between atherosclerotic vascular disease (ASVD) and PD that was independent of known confounders. However, it was not possible to demonstrate causality between these two disorders. Therefore, therapeutic interventions for PD cannot be considered to prevent ASVD-related events at this stage (Lockhart et al., 2012). In a robust meta-analysis of 15 observational studies involving 17,330 patients, Zeng et al. (Zeng et al., 2016) found that periodontal disease was an independent risk factor for atherosclerosis, although these authors reported substantial statistical heterogeneity in their studies.

Ahn and colleagues (Ahn et al., 2016) studied the association between PD and atherosclerosis in an adult Korean population, using carotid intima-media thickness (cIMT) and ankle-brachial index (ABI) as markers of central arterial and lower extremity stenosis, respectively. The authors observed that periodontitis was associated with subclinical atherosclerosis and peripheral arterial disease after adjusting for age, gender, education level, smoking, drinking, exercise, central obesity, triglycerides, HDL, LDL, hs-CRP, diabetes and hypertension (Ahn et al., 2016). These results are consistent with previous studies showing independent associations between periodontitis and both subclinical atherosclerosis (SA) and peripheral arterial disease (PAD), which represent early atherosclerotic vascular changes (Ahn et al., 2016).

The biological mechanism through which PD contributes to atherosclerosis may involve direct bacterial effects on platelets, autoimmune responses, the bacterial invasion of endothelial cells and the systemic upregulation of pro-inflammatory mediators (Gurav, 2014). Periodontal infection may result in a chronic low-grade bacteremia, which may induce both local (at the blood vessel wall) and systemic inflammatory cytokine upregulation, such as IL-1 β , IL-12, IL-18 and TNF- α , causing the increased expression of adhesion molecules and the release of leukocyte chemotactic chemokines, such as MCP-1/CCL2, by the endothelium (Teles & Wang, 2011). The subsequent chemoattracted leukocyte infiltration and cytokine release into the vessel wall can lead to endothelial dysfunction, increasing the likelihood of atherosclerotic plaque formation, which can be detected at the early stages of an atherosclerotic lesion by the thickening of the carotid wall and the decreased patency of arteries in extremities (Ahn et al., 2016). Hence, longer and more severe chronic periodontitis increases the risks of experiencing an atherogenic effect (Ahn et al., 2016) in predisposed and at-risk individuals.

In a cohort of 106 patients with a diagnosis of ischemic stroke or transient ischemic attack (TIA) that were screened for periodontal disease, 27 reported recurrent vascular events (16 with TIA or ischemic stroke) at the 24-month follow-up. However, a survey demonstrated that there was an important association between increased aortic arch

atheroma (AA) plaque thickness and calcification in patients with advanced PD (Sen et al., 2017). Thus, in this study, the authors concluded that, in patients with TIA or ischemic stroke, PD at an advanced stage is associated with an increase in the AA plaque thickness and is therefore, an important risk factor for recurrent vascular events (Sen et al., 2017).

3. ApoE, periodontal disease and atherosclerosis

ApoE is a 34 kDa glycoprotein, discovered in 1970, composed of 299 amino acids and synthesized primarily by the liver and exported to the plasma. ApoE is an important component of all lipoproteins, except LDL, and is involved in the redistribution of triglycerides and cholesterol in various tissues (Mahley, 2016). ApoE, similar to other apoproteins, helps to stabilize and solubilize lipoproteins while circulating in the blood. In general, the role of ApoE in lipid metabolism includes maintaining the integrity of the lipoprotein structure and acting as a ligand for lipoprotein receptors (Mahley, 2016).

The APOE gene is polymorphic, with the three most common alleles being the epsilon E2, E3 and E4 (Huebbe & Rimbach, 2017). Point mutations in the codons result in either a cysteine or arginine residue at positions 112 and 158. In the E2 allele-coded ApoE, cysteine amino acids are found at both positions; in the E3 allele-coded ApoE, there is a cysteine at position 112 and an arginine at position 158; and in the E4 allele-coded ApoE, arginine is found at both positions. The frequency of the E2, E3 and E4 alleles vary widely between different populations, although the E3 allele is the most common, followed by E4 and E2 (Mendes-Lana et al., 2007; Riemenschneider et al., 2002). The E4 allele is considered to be the ancestral allele. In addition to these 3 isotypes, there are other rarer ApoE variants, such as E1, E5 and E7 (Gerdes, 2003).

These modifications of the ApoE isoforms are able to differentially influence lipid metabolism. Due to the tertiary structural conformations of the ApoE molecules (E3 = cys-112, arg-158; E3 = cys-112, arg-158; E4 = arg-112, arg-158), distinct binding forces exist for the ApoE isoforms, either with the LDL receptor or with heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), which are important for cholesterol metabolism. These interactions affect lipid levels, with the ApoE4 allele being more associated with increased total cholesterol (rather than ApoE3 and ApoE3) and increasing the risk for cardiovascular diseases. Helix 4 of the ApoE structure contains the LDL receptor binding region (residues 136–150). In the ApoE 3 and 4 isoforms, the arginine at residue 158 builds a salt bridge with the aspartate at residue 154, allowing the arginine at residue 150 to remain in the highly basic region of the receptor binding site. A diagram of the ApoE isoforms is depicted in Fig. 1. Conversely, in the ApoE2 isoform, the cysteine at residue 158 does not bind to aspartate and, therefore, aspartate is allowed to bind to the arginine at residue 150, which is external to the binding site. As a consequence, the ApoE2 isoform has the lowest binding affinity to the LDL receptor.

Kesaniemi and colleagues were the first to report that the E4 phenotype is associated with an increased intestinal absorption of cholesterol (Kesaniemi, Ehnholm, & Miettinen, 1987). APOE4 is associated with increased cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) and apolipoprotein B levels, effects which can lead to atherosclerosis, hyperlipidemia and cardiovascular diseases (Eichner et al., 2002). An increase in the level of LDL in the systemic circulation can activate endothelial cells and build an inflammatory response, which culminates in macrophage recruitment and atherosclerosis formation. This process is accelerated by an adjacent inflammatory disease, such as PD (Finch & Morgan, 2007; Huebbe et al., 2011).

In a meta-analysis, including 4564 coronary artery disease (CAD) cases and 3985 controls, Yin et al. (2013) documented an association between the E4 allele and an increase in the CAD risk of a Chinese population, accumulating valid evidence (Yin et al., 2013).

Bergdahl, Bergdahl, Nyberg, and Nilsson, (2008) reported on dentate and edentulous individuals and related sociodemographic data,

including years of education, age and living conditions. These authors found that APOE4 was found significantly more frequently in the edentulous group (Bergdahl et al., 2008). However, in a Chinese case/control study, Gao and colleagues found that individuals expressing APOE-rs429358-CC/CT had decreased odds for generalized aggressive periodontitis when compared with individuals expressing the APOE-rs429358-TT polymorphism, after controlling for age, sex, BMI and smoking status (Gao et al., 2015).

These results have raised questions regarding whether genetic factors, such as APOE4, might contribute to an increased risk of developing complex dental diseases that lead to tooth loss, which is an undesirable outcome for any individuals.

Interestingly, vitamin D deficiency has been associated with chronic periodontitis (Abreu et al., 2016). Vitamin D is considered an important immunomodulatory factor, regulating immune responses in the gingival epithelium and influencing the degree of host responses to *P. gingivalis* (De et al., 2017; Huebbe et al., 2011).

In addition, APOE4 has been associated with an improvement in urinary vitamin D reuptake and a more efficient UVB-induced conversion of pro-vitamin D in the skin (Gerdes, 2003). Because APOE4 carriers have been found to have high levels of vitamin D, it can be speculated that APOE4 could protect against periodontal diseases in vitamin D-deficient endemic areas (Huebbe et al., 2011).

Although the relationships between APOE4 and cardiovascular diseases are better known, the existence of an APOE4 risk factor for stroke is controversial (Tang et al., 2018); however, this allele has been associated with subclinical atherosclerotic changes (Dollner et al., 2018) and stroke-related mortality (Rajan et al., 2016).

A model of the potential interactions between APOE4, periodontitis and atherosclerosis is shown in Fig. 2.

4. Oral infection and risk factors for atherosclerosis in animal models

Studies in atherosclerotic-prone mice have suggested that oral pathogens influence the onset and progression of atherosclerosis (Chukkappalli et al., 2014), as shown by increased lipid accumulation in the arterial wall, macrophage infiltration, atheroma plaques, and inflammatory responses (Kebischall, Demmer, & Papapanou, 2010; Tuomainen et al., 2008).

The intraoral inoculation of *Treponema denticola* in 12- and 24-week-old ApoE^{-/-} mice causes chronic oral infection and, consequently, chronic periodontitis, which shows that this pathogen has a strong relationship with periodontal disease and the progression of atherosclerotic disease (Chukkappalli et al., 2014).

Decreased HDL levels and increased total and LDL cholesterol serum levels, along with systemic inflammatory markers, such as C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6), may increase the risk of atherosclerosis (Verri, Paoletti, & Corsini, 2006; Hermus, Lefrandt, Tio, Breek, & Zeebregts, 2010). In the ApoE^{-/-} mouse model, mice subjected to a hyperlipidemic diet and treated with *Fusobacterium nucleatum* showed significantly higher CRP, LDL and IL-6 plasma levels, as well as lower levels of HDL, when compared with controls without *F. nucleatum* administration (Lee, Jun, Kim, Lee, & Choi, 2012). However, oral pathogens, such as *P. gingivalis*, altered vascular responsiveness, mediated by alpha-adrenoreceptors, which may not only cause periodontitis but also atherosclerosis (Gibson et al., 2004; Lalla et al., 2003; Miyauchi et al., 2012; Pereira, Vasquez, Stefanon, & Meyrelles, 2011).

Some authors have indicated that the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice infected with *P. gingivalis* could be prevented and inhibited by the employment of vaccination and human β -defensin-3 (Gibson et al., 2004; Li, Messas, Batista, Levine, & Amar, 2002). In another study, using the same experimental model, a significant 40% increase in the area of the atherosclerotic lesion was identified in the aortic sinus when compared with the uninfected group (Lalla et al., 2003). The advancement of atherosclerosis was also

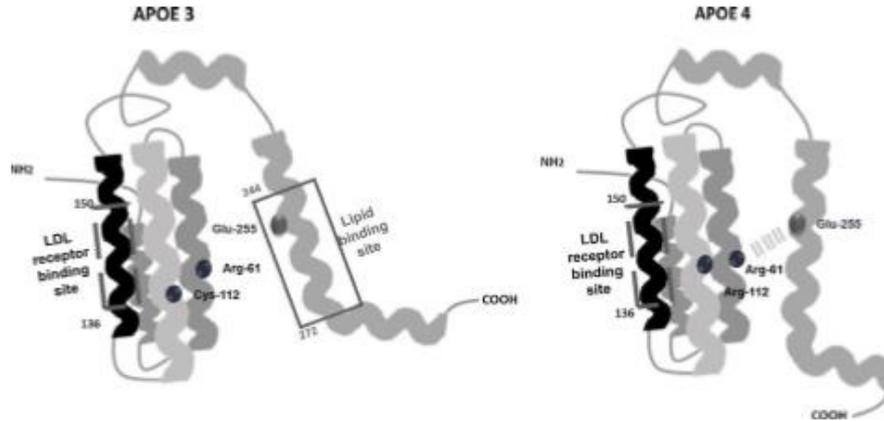


Fig. 1. Schematic of the ApoE3 and ApoE4 molecules. The difference between these molecules is the presence of an arginine residue, (Arg-112 in ApoE4 (Arg-158), while ApoE3 has a cysteine (Cys-112, Arg-158). Note the interaction domain where a salt bridge occurs between Arg-61 and glutamate-255 in ApoE4 but not in ApoE3 (nor in ApoE2, not shown in this figure). This interaction is responsible for an increased affinity for very-low density lipoproteins (VLDL) for ApoE4 instead of the increased affinity for high-density lipoproteins (HDL) that is observed for ApoE3 (and ApoE2).

present in an ApoE-deficient murine model infected with this bacterium (Li et al., 2002).

The immune response of polybacterial infections (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* and *F. nucleatum*) in ApoE null mouse models is different from those observed for individual (monobacterial) infections (Rivera et al., 2013). Polybacterial infections exhibited synergism, inducing a significant increase in plasma risk factors, such as oxidized LDL, nitric oxide, altered lipid profiles and the formation of aortic

plaques (Chukkappalli et al., 2014; Velisko et al., 2015).

In another study, using the same mice models and polymicrobial infections, three of these bacterial strains, with the exception of *F. nucleatum*, were found to result in a significant association between PD and atherosclerotic disease, and the presence of a polymicrobial infection by both areas of the aorta was identified in several of the infected mice through the PCR analysis of thoracic and abdominal aorta samples (Cui, Li, Lei, Chen, & Yan, 2016; Rivera et al., 2013),

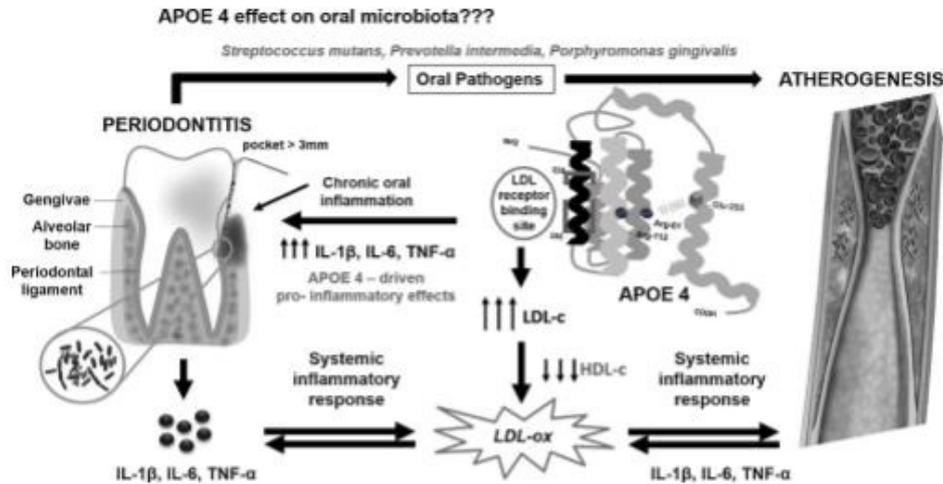


Fig. 2. A model for potential interactions among ApoE4, periodontal disease (PD) and atherosclerosis. APOE4 is associated with increased levels of circulating cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) and pro-inflammatory cytokines. The increased in LDL levels in the systemic circulation may favor the formation of LDL-oxidation, generating LDL-ox, which is known to activate endothelial cells and vascular inflammatory responses, which may culminate in monocyte-macrophage recruitment and differentiation and potentially atherosclerosis. This process may be accelerated by a coexistent chronic inflammatory disease, such PD, and may be associated with other comorbidities and risk factors, such as a western life style. ApoE4 may have a key influence on the oral microbiota (although this effect remains unexplored in the literature). Periodontitis may also favor atherosclerosis, through the translocation of oral pathogens to the atherogenic plate and a further increase in the systemic inflammatory response.

Table 1
Effects of periodontitis pathogens on atherosclerotic disease in apoE-deficient mice.

Recipient mice	Pathogen	Findings	Title	Reference
ApoE ^{-/-}	<i>P. gingivalis</i>	ApoE ^{-/-} mice challenged with wild-type <i>P. gingivalis</i> presented with increased levels of atherosclerotic plaque and expressed the innate immune response markers TLR2-like receptor (TLR2) and TLR4 in aortic tissue.	Innate immune recognition of invasive bacteria accelerated atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.	Gibson et al. (2004)
ApoE ^{-/-}	does not identify	Non-surgical, periodontal treatment (NSPT) reduced alveolar bone loss (ABL), lipid profile and inhibited systemic inflammation with reduced interleukin (IL-6), as well as decreased inflammation in the arterial wall, showing reduced expression of vascular cell adhesion molecules and reduced adhesion of macrophages.	Non-surgical periodontal treatment reduced aortic inflammation in ApoE ^{-/-} mice with periodontitis.	Cui et al. (2016)
ApoE ^{-/-}	<i>P. gingivalis</i>	Infected rats showed improved vascular activation, as suggested by the increased aortic expression of vascular cell adhesion molecule 1 and tissue factor.	Oral infection with a periodontal pathogen accelerated early atherosclerosis in Apolipoprotein E-null mice	Lalla et al. (2008)
ApoE ^{-/-}	<i>P. gingivalis</i>	Increased proliferation and IgG production in response to <i>P. gingivalis</i> was observed in the infected group.	Oral infection with <i>Porphyromonas gingivalis</i> and systemic cytokine profile was observed in C57BL/6, KOH-ApoE ^{-/-} mice.	Miyachi et al. (2012)
ApoE ^{-/-}	<i>P. gingivalis</i> , <i>T. denticola</i> and <i>T. forsythia</i>	Development of periodontal disease was observed primarily for <i>P. gingivalis</i> and <i>T. denticola</i> . Polymicrobial infection demonstrated increased levels of aortic plaques, with the accumulation of macrophages and increased levels of cholesterol and triglycerides.	Polymicrobial infection with major periodontal pathogens induced periodontal disease and aortic atherosclerosis in hyperlipidemic ApoE ^{-/-} mice.	Rivara et al. (2013)
ApoE ^{+/+}	<i>P. gingivalis</i>	Within 10 weeks, the animals treated with the pathogen had more advanced atherosclerotic lesions, and all of the lesions were rich in macrophages, indicating an association between periodontal disease and atherosclerosis.	Porphyromonas gingivalis infection accelerated the progression of atherosclerosis in a heterozygous Apolipoprotein E-deficient murine model.	Li et al. (2002)
ApoE ^{-/-}	<i>P. nucleatum</i>	GroEL induced chemokine expression and tissue factor activity and reduced tissue factor pathway inhibitor activity. It has also been observed in the formation of foam cells, indicating that the host's response to the GroEL, expressed by periodontal pathogens, such as <i>P. nucleatum</i> , may be a mechanism involved in atherosclerosis, supporting the association between periodontitis and systemic infection.	<i>Pseudomonas nucleatum</i> GroEL induced risk factors of atherosclerosis in human microvascular endothelial cells and ApoE ^{-/-} mice.	Lee et al. (2012)
ApoE ^{-/-}	<i>T. denticola</i>	<i>T. denticola</i> infections were related to altered gene expression and were involved in atherosclerotic development, increased atherosclerotic plaque area, serum low-density lipoprotein (LDL) levels of serum nitric oxide (NO) levels.	Investion of oral and aortic tissues by oral spirochete <i>Treponema denticola</i> in ApoE ^{-/-} mice causally linked periodontal disease and atherosclerosis.	Chakraborti et al. (2014)
ApoE ^{-/-}	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. gingivalis</i> altered the vascular responsiveness mediated by alpha adrenoreceptors	Oral <i>P. gingivalis</i> infection altered the vascular reactivity in healthy and spontaneously atherosclerotic mice	Perreira et al. (2011)
ApoE ^{-/-}	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i> induced changes in serum C-reactive protein (CRP) levels, proatherogenic lipoprotein profiles, such as very low density (VLDL) and low density lipoprotein (LDL), known to promote the development of atherosclerosis and high-density lipoprotein (HDL) functions.	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> induced MCP-1 expression and proatherogenic lipoprotein profile in apoE-deficient mice.	Tsumahara et al. (2008)

Table 2
ApoE polymorphisms in oral disease.

Research Design	Sample	Findings	Title	Reference
case-control study	469 subjects	This investigation did not show a significant association between ApoE polymorphisms and CRP; however, patients presented increased levels of low-density lipoprotein (LDL) and total cholesterol (TC). Individuals with combined polymorphisms E4/E4 and APOE-ε4/ε4 (E4/E4-CC/CT) had higher levels of low-density lipoprotein cholesterol, higher levels of TC and decreased odds of generalized aggressive periodontitis. ApoE E3 is found most frequently in this population. Patient age, life condition, years of education and APOE E4 were significant covariates in edentulous subjects.	ApoE polymorphisms in relation to chronic periodontitis, periodontopathic bacteria, and lipid levels	Berilova Lisharova et al. (2013)
case-control study	323 subjects	Associations of apolipoprotein E and low-density lipoprotein receptor-related protein 5 polymorphisms with dyslipidemia and generalized aggressive periodontitis in a Chinese population	Associations of apolipoprotein E and low-density lipoprotein receptor-related protein 5 polymorphisms with dyslipidemia and generalized aggressive periodontitis in a Chinese population	Gao et al. (2015)
case-control study	1,860 subjects	Difference in apolipoprotein E type 4 allele (APOE ε4) among dentate and edentulous subjects	Difference in apolipoprotein E type 4 allele (APOE ε4) among dentate and edentulous subjects	Berglund et al. (2008)

demonstrating that periodontitis caused by binding in experimental models may trigger an inflammatory response in the vascular wall and that nonsurgical periodontal treatment during the early stages of atherosclerosis can reduce systemic inflammation, improving the lipid profile (Cui et al., 2016).

To date, preclinical studies have consistently demonstrated that periodontal pathogens are able to translocate from the oral microbiota to atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice (see Table 1 for a summary of the revised literature relating periodontitis pathogens and atherosclerotic lesions). However, only three studies have reported on the effects of APOE polymorphisms in individuals with oral diseases and their associations with cardiovascular risk (Table 2).

5. APOE4, a candidate gene for antagonistic pleiotropy in oral infections?

Cohort studies in Brazilian shantytown communities with poor hygiene and sanitation have highlighted a protective role for the APOE4 allele in children with a history of heavy diarrhea illnesses during the first years of life in areas endemic for enteric infections and malnutrition (Oria et al., 2010, 2005). The APOE4 allele was associated with improved cognitive scores (in a subset of children with heavy diarrheal burdens), even though APOE4 is considered to be deleterious and to increase the risk of developing Alzheimer's disease later in life (Kim, Basak, & Holtzman, 2009; Strittmatter, 2001; Yamazaki, Painter, Bu, & Kanekiyo, 2016). These initial studies were supported by findings from the Bolivian Tsimane populations, which are highly exposed to enteric infections, where APOE4 was associated with lower C-reactive protein (CRP) serum levels (Vasunilashorn et al., 2011), which is a marker of systemic inflammation, suggesting reduced infection-driven inflammatory responses.

In another study from the same group, non-APOE4 carriers with a high parasite burden (those with high IgE serum levels) showed a reduction in cognitive performance, which was not observed in APOE4 carriers (Trumble et al., 2017). These studies suggest that APOE4 might display an antagonistic pleiotropy effect, which means it may be helpful early in life during environmental challenges, such as enteric infections and malnutrition (which prevail in nonindustrialized human civilization). This idea suggests that APOE4 is better fitted for traits related to protection against pathogens and improved fertility (van et al., 2017); however, later in life, it is known to be detrimental during aging-related diseases (Pinch & Morgan, 2007). This same premise may be applied to oral infections. Precivilized meat hunters were likely afflicted with severe dental diseases (and enteric diseases) and oral microbiota changes (Weyrich et al., 2017) but did not live long enough to develop age-related cardiovascular and Alzheimer's diseases. Therefore, it can be speculated that APOE4 might have played a significant role in this protection. The relationships between APOE4 carriers and the oral microbiota and dental diseases, both during early life and with aging, require further investigation, particularly in regard to western diets. In addition, the associations between APOE4, periodontal diseases and Alzheimer's disease still require further research. One study has documented associations between a low number of teeth, a low level of APOE4 and lower delayed word recall scores in elderly patients in Milwaukee, WI, USA (Stein, Kryscio, Desrosiers, Donegan, & Gibbs, 2010).

The interactions between chronic cardiovascular disease, Alzheimer's disease and periodontitis still remain an unexplored field, and research initiatives are unfortunately unrepresented in worldwide populations, especially in the developing world. A diagram of these relationships is shown in Fig. 3.

6. Summary

The direct causality between atherosclerosis and periodontal diseases is challenging to dissect, due to common etiological roots, such as

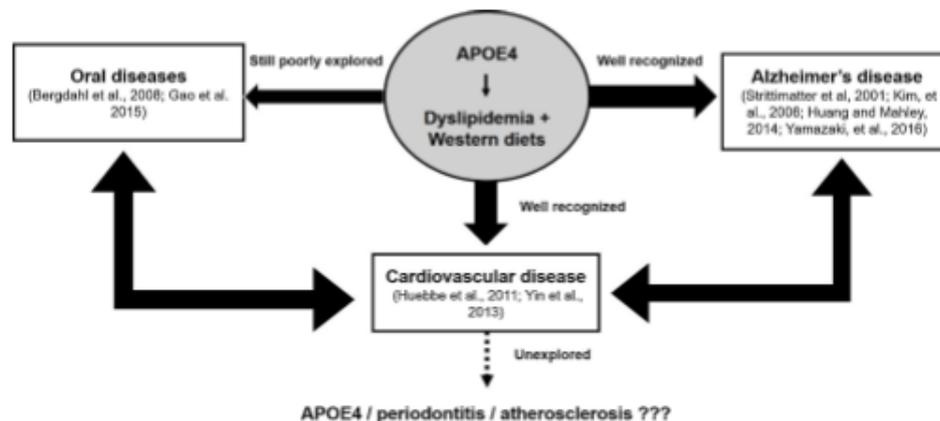


Fig. 3. A schematic diagram depicting the up-to-date, recognized interactions with ApoE4, along with cardio-metabolic risk factors (dyslipidemia and western diet), that are associated with cardiovascular, Alzheimer's and oral diseases.

aging, life-style (diet, sedentarism), and immune-inflammatory and genetic factors. Apolipoprotein E4 (APOE4) is an attractive gene because it has been extensively associated with increased risks and worse outcomes for cardiovascular diseases.

In human evolution, APOE4 is considered to be the ancestral APOE allele, and its preservation in our genetic pool may be related to its role in improving infectious diseases, which were ubiquitous in the pre-industrialized era (Oría, Patrick, Blackman, Lima, & Guarrant, 2007; Trumble et al., 2017). Therefore, the occurrence of APOE4 might be an example of antagonistic pleiotropy, as this gene may be protective under heavy burdens of enteric infections and an adverse environment (by raising innate immunity and inflammation (Gale et al., 2014)) early in life (Oría et al., 2005; van et al., 2017), while being deleterious during aging, contributing to atherosclerosis if one lives long enough in western societies. The antagonistic pleiotropy of genes related to worse CAD outcomes (such as APOE4) are designed for adverse environments during human evolution, which have been reported previously (Corbett, Courtiol, Lummaa, Moorad, & Stearns, 2018; van et al., 2017).

Early human populations were also often afflicted with chronic dental diseases and related-oral infections (in the preantimicrobial therapy era), for which APOE4 would be potentially protective (this unexplored area deserves attention in future studies); however, with this trade-off, individuals become more prone to later cardiovascular diseases if one lives long enough, as we have observed in modern times in western societies. The lack of long-term cohorts and clinical studies examining APOE polymorphisms, especially in deprived countries, have hampered the understanding of how APOE4 affects oral pathogens and related inflammatory responses and how these effects could be associated with atherosclerotic plaques. Studies performed in both clinical settings and using APOE4 target-replacement mice are required. Long-term cohort studies with larger sample numbers in developing countries and humanized APOE4 knock-in mice are warranted to evaluate the causal association between APOE4, PD and atherosclerosis, especially when considering the periodontal biofilm and its potential atherogenic effects.

In addition, currently, clinicians aim for minimally invasive strategies to manage dental diseases. Over the years, when older patients enter a restorative cycle, as a consequence of a series of traditionally invasive approaches, and present a high disease burden, early detection and prevention are the keys to managing dental diseases. APOE4 could be a marker for both dental and chronic systematic disease outcomes. Therefore, further laboratory and clinical studies are required to

investigate these effects.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank Raul S. Freitas for helping with the manuscript preparation. This work was supported by the Foundation of Support to the Scientific and Technological Development of the State of Ceará/Brazil (FUNCAP) PPSUS grant, the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) Procad (071/2013 # 144494), and by the National Council for Science and Technological Development (CNPq) (grant number 467143/2014-5).

References

- Abreu, O. J., Tatakis, D. N., Elias-Beaeta, A. R., Lopez, D., Hernandez, R., Poma, M. S., et al. (2016). Low vitamin D status strongly associated with periodontitis in Puerto Rican adults. *BMC Oral Health*, 16(1), 89.
- Ahn, Y. B., Shin, M. S., Han, D. H., Sukhbaatar, M., Kim, M. S., Shin, H. S., et al. (2016). Periodontitis is associated with the risk of subclinical atherosclerosis and peripheral arterial disease in Korean adults. *Atherosclerosis*, 257, 311–318.
- Azevedo, O. G., Jelick, D. T., Roche, J. K., Pinkerton, R. F., Lima, A. A., Vitak, M. P., et al. (2014). Apolipoprotein E plays a key role against cryptosporidial infection in transgenic undernourished mice. *PLoS One*, 9(2), e89562.
- Azevedo, O. G., Oliveira, R. A., Oliveira, R. C., Zaja-Milanovic, S., Aranjó, C. V., Wong, D. V., et al. (2012). Apolipoprotein E-GG 133 mimetic peptide improves 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. *BMC Gastroenterology*, 12(35).
- Baer, M. T., Huang, N., & Gibson, F. C., III (2009). Scavenger receptor A is expressed by macrophages in response to Porphyromonas gingivalis, and participates in TNF- α expression. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(6), 456–463.
- Berglundh, M., Berglundh, J., Nyberg, L., & Nilsson, L. G. (2008). Difference in apolipoprotein E type 4 allele (APOE epsilon 4) among dentate and edentulous subjects. *Gerodontology*, 25(3), 179–186.
- Borilova Linhartova, P., Bartova, J., Poskocova, H., Machal, J., Vokurka, J., Fassmann, A., et al. (2015). Apolipoprotein E gene polymorphisms in relation to chronic periodontitis, periodontopathic bacteria, and lipid levels. *Arch Oral Biology*, 60(3), 456–462.
- Calapokur, M. U., Alkan, B. A., Tascemir, Z., Akcilli, Y., & Saatci, E. (2017). Association of peripheral arterial disease with periodontal disease: Analysis of inflammatory cytokines and an acute phase protein in gingival crevicular fluid and serum. *Journal of Periodontal Research Supplement*, 52(3), 532–539.
- Cardoso, E. M., Reis, C., & Manzaneres-Caspeda, M. C. (2018). Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases. *Postgraduate Medicine*, 130(1), 98–104.
- Chistiakov, D. A., Grekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2016). Links between

- atherosclerotic and periodontal disease. *Experimental and Molecular Pathology*, 100(1), 220–235.
- Cho, M. I., & Garant, P. R. (2000). Development and general structure of the periodontium. *Periodontology*, 24(2000), 9–27.
- Chukkappalli, S. S., Rivea, M. F., Velho, I. M., Lee, J. Y., Chen, H., Zheng, D., et al. (2014). Invasion of oral and aortic tissues by oral spirochete *Treponema denticola* in ApoE(-/-) mice causally links periodontal disease and atherosclerosis. *Infection and Immunity*, 82(5), 1959–1967.
- Corbett, S., Courtiol, A., Lammusa, V., Moorad, J., & Stearns, S. (2018). The transition to modernity and chronic disease: Mismatch and natural selection. *Nature Reviews Genetics*.
- Cui, D., Li, H., Lai, L., Chen, C., & Yan, F. (2016). Non-surgical periodontal treatment reduced aortic inflammation in ApoE(-/-) mice with periodontitis. *Springerplus*, 5(1) 940.
- Dalcino, R., de Menezes, A. M., Deslociano, O. B., Oria, R. B., Vale, M. L., Ribeiro, R. A., et al. (2013). Protective mechanisms of simvastatin in experimental periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 84(9), 1145–1157.
- De, F. A., Fiorentino, M., Guida, L., Annunziata, M., Nastro, L., & Rizzo, A. (2017). Vitamin D reduces the inflammatory response by Porphyromonas gingivalis infection by modulating human beta-defensin-3 in human gingival epithelium and periodontal ligament cells. *International Immunopharmacology*, 47, 106–117.
- de Vries, T. J., Andereetta, S., Lora, B. G., & Nicu, R. A. (2017). Genes critical for developing periodontitis: Lessons from mouse models. *Frontiers in Immunology*, 8 1395.
- DeBeer, M. D., Lima, A. A., Oria, R. B., Scharf, R. J., Moore, S. R., Lima, M. A., et al. (2012). Early childhood growth failure and the developmental origins of adult disease: do enteric infections and malnutrition increase risk for the metabolic syndrome? *Nutrition Reviews*, 70(11), 642–653.
- Doliner, B., Dong, C., Blasson, S. H., Gardner, H., Elkind, M. S. V., Sacco, R. L., et al. (2018). Apolipoprotein E gene polymorphism and subclinical carotid atherosclerosis: The northern Manhattan study. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 27(3), 645–652.
- Eichner, J. E., Dunn, S. T., Perveen, G., Thompson, D. M., Stewart, K. E., & Stroobla, B. C. (2002). Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: A HUGO review. *American Journal of Epidemiology*, 155(6), 487–495.
- Ecate, R., Padro, T., & Badimon, L. (2016). LDL accelerates monocyte to macrophage differentiation: Effects on adhesion and anoikis. *Atherosclerosis*, 246, 177–186.
- Ferr, N., Paolletti, R., & Corsini, A. (2006). Biomarkers for atherosclerosis: Pathophysiological role and pharmacological modulation. *Current Opinion in Lipidology*, 17(5), 495–501.
- Finch, C. E., & Morgan, T. E. (2007). Systemic inflammation, infection, ApoE alleles, and Alzheimer disease: A position paper. *Current Alzheimer Research*, 4(2), 185–189.
- Guillard, J. M., & Lemaître, J. F. (2017). The Williams' legacy: A critical reappraisal of his nine predictions about the evolution of senescence. *Evolution*, 71(12), 2768–2785.
- Gale, S. C., Gao, L., Mikacmic, C., Coyk, S. M., Rafaeel, N., Murray, D. T., et al. (2014). ApoEepsilon4 is associated with enhanced in vivo innate immune responses in human subjects. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(1), 127–134.
- Gao, H., Tian, Y., Meng, H., Hou, J., Xu, L., Zhang, L., et al. (2015). Associations of apolipoprotein B and low-density lipoprotein receptor-related protein 5 polymorphisms with dyslipidemia and generalized aggressive periodontitis in a Chinese population. *Journal of Periodontal Research*, 50(4), 509–518.
- Gardes, L. U. (2005). The common polymorphism of apolipoprotein E: Geographical aspects and new pathophysiological relations. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 43(5), 628–631.
- Gez, G. S., & Reardon, C. A. (2016). Do the ApoE-/- and Ldlr-/- Mice Yield the Same Insight on Atherosclerosis? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(9), 1734–1741.
- Gibson, F. C., Hoag, C., III, Chou, H. H., Yumoto, H., Chen, J., Lien, E., et al. (2004). Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 109(22), 2801–2806.
- Goncalves, D. C., Evangelista, R. C., da Silva, R. R., Santos, M. J., Silva, F. S., Jr., Aragao, E. S., et al. (2014). Infliximab attenuates inflammatory osteolysis in a model of periodontitis in Wistar rats. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, NJ)*, 239(4), 442–453.
- Guzav, A. N. (2014). The implication of periodontitis in vascular endothelial dysfunction. *European Journal of Clinical Investigation*, 44(10), 1000–1009.
- Hajishengallis, G., & Sahlgren, S. E. (2014). Novel inflammatory pathways in periodontitis. *Advances in Dental Research*, 26(1), 25–29.
- Hermus, L., Lefrandt, J. D., Tio, R. A., Breek, J. C., & Zeebregts, C. J. (2010). Carotid plaque formation and serum biomarkers. *Atherosclerosis*, 213(1), 21–29.
- Huebner, P., & Rimbach, G. (2017). Evolution of human apolipoprotein E (APOE) isoforms: Gene structure, protein function and interaction with dietary factors. *Ageing Research Reviews*, 37, 146–161.
- Huebner, P., Nebel, A., Sieget, B., Mochling, J., Briesch-Saadatmandi, C., Most, E., et al. (2011). APOE epsilon4 is associated with higher vitamin D levels in targeted replacement mice and humans. *FASEB Journal*, 25(9), 3262–3270.
- Kebuchall, M., Demmer, R. T., & Papapanou, P. N. (2010). "Gum bug, leave my heart alone!"—epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *Journal of Dental Research*, 89(9), 879–902.
- Kesäniemi, Y. A., Ehnholm, C., & Miettinen, T. A. (1987). Intestinal cholesterol absorption efficiency in man is related to apoprotein E phenotype. *The Journal of Clinical Investigation*, 80(2), 578–581.
- Kim, J., Busk, J. M., & Holtzman, D. M. (2009). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63(3), 287–303.
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 3 17038.
- Lalla, E., Lamster, I. B., Hofmann, M. A., Bucciarelli, L., Jerud, A. P., Tucker, S., et al. (2003). Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(8), 1405–1411.
- Lee, H. R., Joo, H. K., Kim, H. D., Lee, S. H., & Choi, B. K. (2012). Fusobacterium nucleatum GroEL induces risk factors of atherosclerosis in human microvascular endothelial cells and ApoE(-/-) mice. *Molecular Oral Microbiology*, 27(2), 109–123.
- Li, L., Messas, E., Batista, E. L., Jr., Levine, R. A., & Amar, S. (2002). Porphyromonas gingivalis infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. *Circulation*, 105(7), 861–867.
- Lockhart, P. B., Bolger, A. F., Papapanou, P. N., Osimbawale, O., Trevisan, M., Levinson, M. E., et al. (2012). Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: Does the evidence support an independent association? A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 125(20), 2520–2544.
- Mahley, R. W. (2016). Apolipoprotein E: From cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *Journal of Molecular Medicine*, 94(7), 739–746.
- Mattila, K. J., Nieminen, M. S., Valtonen, V. V., Rasi, V. P., Kesäniemi, Y. A., Syrjälä, S. L., et al. (1989). Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ*, 298(6676), 779–781.
- Mendes-Jama, A., Pena, G. G., Freitas, S. N., Lima, A. A., Niclato, R. L., Nascimento-Neto, R. M., et al. (2007). Apolipoprotein e polymorphism in Brazilian dyslipidemic individuals: Ouro preto study. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(1), 49–56.
- Miyachi, S., Mackawa, T., Aoki, Y., Miyazawa, H., Tobe, K., Nakajima, T., et al. (2012). Oral infection with Porphyromonas gingivalis and systemic cytokine profile in CS7B/6J.ApoE(-/-) mice. *Journal of Periodontal Research Supplement*, 47(3), 402–408.
- Narishi, K., & Nagata, T. (2018). Biological effects of interleukin-6 on Gingival Fibroblasts: Cytokine regulation in periodontitis. *Journal of Cellular Physiology*.
- Nazir, M. A. (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International Journal of Health Science (Quresh)*, 11(2), 72–80.
- Nguyen, C. M., Kim, J. W., Quon, V. H., Nguyen, B. H., & Yim, S. D. (2015). Periodontal associations in cardiovascular diseases: The latest evidence and understanding. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 5(3), 203–206.
- Oria, R. B., Patrick, P. D., Blackman, J. A., Lima, A. A., & Górrant, R. L. (2007). Role of apolipoprotein E4 in protecting children against early childhood diarrhea outcomes and implications for later development. *Medical Hypotheses*, 68(5), 1099–1107.
- Oria, R. B., Patrick, P. D., Oria, M. G., Lenz, B., Thompson, M. R., Azevedo, O. G., et al. (2010). ApoE polymorphisms and diarrheal outcomes in Brazilian shanty town children. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43(3), 249–256.
- Oria, R. B., Patrick, P. D., Zhang, H., Lenz, B., de Castro Costa, C. M., Brito, G. A., et al. (2005). APOE4 protects the cognitive development in children with heavy diarrhea burden in Northeast Brazil. *Pediatric Research*, 57(2), 310–316.
- Pereira, R. B., Vasquez, E. C., Stefanelo, I., & Meyrelles, S. S. (2011). Oral P. Gingivalis infection alters the vascular reactivity in healthy and spontaneously atherosclerotic mice. *Lipids in Health and Disease*, 10 80.
- Rajan, K. B., Aggarwal, N. T., Schneider, J. A., Wilson, R. S., Everson-Rose, S. A., & Evans, D. A. (2016). Role of APOE epsilon4 allele and incident stroke on cognitive decline and mortality. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 30(4), 318–323.
- Rajendra Srinivas, A. B., Ogle, O. R., Williams, D., & Woodbine, E. F. (2017). Epidemiology of oral and maxillofacial infections. *Dental Clinics of North America*, 61(2), 217–233.
- Riemenschneider, M., Schwarz, S., Wagenpfeil, S., Diehl, J., Müller, U., Fostel, H., et al. (2002). A polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is associated with Alzheimer's disease in patients lacking the ApoEepsilon4 allele. *Molecular Psychiatry*, 7(7), 782–785.
- Rivea, M. F., Lee, J. Y., Aneja, M., Goswami, V., Liu, L., Velho, I. M., et al. (2013). Polymicrobial infection with major periodontal pathogens induced periodontal disease and aortic atherosclerosis in hyperlipidemic ApoE(null) mice. *PLoS One*, 8(2) e57178.
- Sen, S., Chung, M., Duda, V., Gamberardino, L., Hindlelter, A., & Offenbacher, S. (2017). Periodontal disease associated with aortic arch atheroma in patients with stroke or transient ischemic attack. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association*, 26(10), 2137–2144.
- Stein, P. S., Kryscio, R. J., Desrosiers, M., Deegan, S. J., & Gibbs, M. B. (2010). Tooth loss, apolipoprotein E, and decline in delayed word recall. *Journal of Dental Research*, 89(5), 473–477.
- Strittmatter, W. J. (2001). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: Signal transduction mechanisms. *Biochemical Society Symposium*, 67, 101–109.
- Tang, E. Y., Amietimaka, O., Harrison, S. L., Green, E., Price, C., Robinson, L., et al. (2018). Longitudinal effect of stroke on cognition: A systematic review. *Journal of the American Heart Association*, 7(2).
- Teles, R., & Wang, C. Y. (2011). Mechanisms involved in the association between periodontal diseases and cardiovascular disease. *Oral Diseases*, 17(5), 450–461.
- Teo, K. K., & DeKamish, H. (2017). The emerging epidemic of cardiovascular risk factors and atherosclerotic disease in developing countries. *The Canadian Journal of Cardiology*, 33(3), 358–365.
- (1992). Guidelines for the diagnosis of rheumatic fever. Jones Criteria, 1992 update. Special Writing Group of the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the Young of the American Heart Association. *JAMA*, 268(15), 2069–2073.
- Trumble, B. C., Steglitz, J., Blackwell, A. D., Allayou, H., Behaim, B., Finch, C. E., et al. (2017). Apolipoprotein E4 is associated with improved cognitive function in Amazonian forager-horticulturalists with a high parasite burden. *FASEB Journal*, 31(4), 1508–1515.
- Tumlinello, E. R., & Han, S. D. (2011). The apolipoprotein e antagonistic pleiotropy

- enhances inflammatory markers with an atheroprotective immune response in ApoE (null) mice. *PLoS One*, 16(6) e0259795.
- Weyrich, L. S., Duchene, S., Soubrier, J., Arriola, L., Lamas, B., Breen, J., et al. (2017). Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus. *Nature*, 544(7650), 357–361.
- Yamashiki, Y., Painter, M. M., Bu, G., & Kanekiyo, T. (2016). Apolipoprotein e as a therapeutic target in Alzheimer's disease: A review of basic research and clinical evidence. *CNS Drugs*, 30(9), 773–789.
- Yin, Y. W., Sun, Q. Q., Zhong, B. B., He, A. M., Liu, H. L., Wang, Q., et al. (2013). Association between apolipoprotein E gene polymorphism and the risk of coronary artery disease in Chinese population: Evidence from a meta-analysis of 40 studies. *PLoS One*, 8(6) e6924.
- Zeng, X. T., Leng, W. D., Lam, Y. Y., Yan, B. P., Wei, X. M., Wong, H., et al. (2016). Periodontal disease and carotid atherosclerosis: A meta-analysis of 17,330 participants. *International Journal of Cardiology*, 203, 1044–1051.