

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA**

**Dissertação de Mestrado**

**Sobrecarga de Ferro no tecido hepático de pacientes  
portadores de hepatite crônica pelo Vírus C**

***Rosicreusa Marback de Souza***

**Salvador - Bahia  
2004**





Universidade Federal da Bahia  
Faculdade de Medicina da Bahia  
Departamento de Medicina  
Curso de Pós - Graduação em Medicina Interna

Dissertação de Mestrado

Sobrecarga de Ferro no tecido hepático de pacientes  
portadores de hepatite crônica pelo Vírus C

Dissertação apresentada ao colegiado de curso da Pós - Graduação em Medicina, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre em Medicina, da área de concentração de Medicina Interna.

**Autor:**

*Rosicreusa Marback de Souza*

**Professor Orientador:**

*Luiz Guilherme da Costa Lyra*

Salvador - Bahia



### Ficha Catalográfica

S725

Souza, Rosicreusa Marback de,  
Sobrecarga de ferro no tecido hepático de pacientes  
portadores de  
hepatite crônica pelo Vírus C/ Rosicreusa Marback de  
Souza . – Salvador:  
Rosicreusa Marback de Souza, 2004.  
x, 129 p. : il.

Dissertação (Mestrado e Saúde) Faculdade de  
Medicina. Universidade  
Federal da Bahia.

LILDB1

616.36-002  
S725 1

MFV 3394  
001677



Universidade Federal da Bahia  
Faculdade de Medicina da Bahia  
Departamento de Medicina  
Curso de Pós - Graduação em Medicina Interna

Dissertação de Mestrado

Sobrecarga de Ferro no tecido hepático de pacientes  
portadores de hepatite crônica pelo Vírus C

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Membros titulares:

1. **Luiz Guilherme da Costa Lyra**- (Professor-orientador) – Professor Livre-Docente de Clínica Médica da Universidade Federal da Bahia, Professor titular de Clínica Médica da Universidade Federal da Bahia, Chefe do Serviço de Gastro-Hepatologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia.
2. **Luiz Antônio Rodrigues Freitas**- Professor adjunto de Patologia da Universidade Federal da Bahia, Pesquisador Titular da Fundação Oswaldo Cruz.
3. **Helma Pinchinel Cotrim**- Professora adjunta – Doutora do Departamento de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia.

Membro Suplente:

1. **André Castro Lyra**- Doutor em Gastroenterologia pela Universidade de São Paulo

Salvador – Bahia  
2004

*O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele.*

*Destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto.*

**Thomas Huxley**

Aos meus filhos **Lucas Marback de Souza Brasil** e **Juliana Marback de Souza Brasil** meus eternos companheiros. Pessoas que me fazem ver todos os dias que a vida vale a pena e que dão mais brilho a tudo que eu faço. Pelo amor, carinho, incentivo e grande paciência, obrigado.

Aos meus pais **Creusa Marback de Souza** e **Caetano Rosemi de Souza** pelos valores que embasam a minha vida, pelo amor e carinho eternos.

Aos meus irmãos **Clécio**, **Clerivaldo** e **Clodes** pelo incentivo, carinho e pela disponibilidade.

## Recursos

---

- Bolsa CAPES, março de 2000 a março de 2001.
- Os testes laboratoriais realizados no presente trabalho foram feitos através do Serviço de Gastro-Hepatologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos e do Serviço de Gastro-Hepatologia do Hospital São Rafael.
- O preparo das lâminas de biópsia foi realizado através Fundação Oswaldo Cruz.

## AGRADECIMENTOS:

---

1. Ao **Professor Luiz Guilherme da Costa Lyra** - Meu mestre, grande exemplo de profissionalismo, meu orientador nesse projeto, mas que durante todos esses anos vem contribuindo de maneira brilhante para minha formação não só profissional como moral, muito obrigado por acreditar no meu trabalho.
2. Ao **Professor Luiz Antônio Rodrigues Freitas**- Não só pelo competente apoio técnico e pela grande contribuição científica mas também pela disponibilidade e dedicação durante esse trabalho.
3. Ao **Professor Carlos Maurício Cardeal**- Pelo competentíssima orientação científica e sobretudo pela dedicação e apoio durante esta trajetória.
4. Ao **Professor André Luiz Peixinho**- Um grande mestre na minha vida, que nos momentos cruciais esteve comigo me ajudando na escolha do caminho certo.
5. Ao **Hospital São Rafael** - Por ter permitido a realização deste trabalho e pela credibilidade a mim dispensada.
6. À **Dra. Ana Cristina Guimarães** - Amiga muito especial que sempre me deu apoio, agradeço pela presença constante nas minhas decisões pelo carinho e pela contribuição científica neste trabalho.
7. À **Dra. Márcia Regina de Souza** - Amiga querida agradeço pelo apoio nessa jornada, pelo carinho e companheirismo de tantos anos.



8. À **Dra. Maria das Graças Pinheiro** - Grande amiga agradeço pela disponibilidade, pelas opiniões bastante úteis e pela grande contribuição científica.
9. Ao **Dr. Gilvandro de Almeida Rosa** - Amigo muito presente quem muito contribuiu com suas experiências acadêmicas e cujas orientações foram bastante úteis para a conclusão deste trabalho.
10. A **José Augusto de Miranda** - Pelo carinhoso, apoio e principalmente pela grande ajuda técnica.
11. Ao **Dr. André Castro Lyra** – Amigo que esteve muito presente neste trabalho e cuja contribuição científica foi fundamental para a sua conclusão .
12. À **Dra. Cremilda França Moraes**- Companheira e amiga, agradeço o apoio e o incentivo para continuar este trabalho, além da grande contribuição científica.
13. Ao **Dr. Eduardo Lorens Braga** - Que muito colaborou neste trabalho com dados científicos muito importantes.
14. Ao **Hospital Universitário Professor Edgard Santos**- Pela grande contribuição neste trabalho fornecendo as lâminas de biópsias e na permissão ao acesso aos dados dos pacientes.
15. Ao **Hospital Aliança**- Por possibilitar a realização desse trabalho permitindo o acesso a prontuários e lâminas de biópsias.
16. Ao **Professor Marco Antônio Almeida**- Pela contribuição científica importante para a execução do trabalho.

17. Ao **Professor Luciano Espinheira**- Pela grande contribuição para o nosso trabalho permitindo, com muita disponibilidade o acesso às lâminas de biópsia no Hospital Universitário Professor Edgard Santos.
18. Ao **Sr. Salvador Adorno de Jesus**- Que teve fundamental importância na execução deste trabalho pacientemente selecionando as lâminas de biópsia dos pacientes do Hospital São Rafael, muito obrigado pela sua contribuição.
19. Ao **Professor Paulo Athanázio**- Pela contribuição científica importante para a execução deste trabalho.
20. Ao **Professor Sérgio Santana** – Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Aliança nossos agradecimentos por toda sua disponibilidade e atenção a nós prestadas durante a execução do trabalho.
21. À **Srta. Virgínia Damaris Rodrigues da Silva**- Funcionária exemplar, pelo auxílio técnico com muita presteza durante esse trabalho.
22. À **Sra. Ana Rosa Montenegro Marques**- Bibliotecária do Hospital São Rafael pela sua contribuição muito importante.
23. À **Sra. Maria Auxiliadora Coutinho Moreira**- Também bibliotecária do Hospital São Rafael que muito contribuiu para este trabalho.
24. À **Dra. Lourianne Nascimento Cavalcante**- Que muito contribuiu na coleta de dados.
25. Aos Doutores **Tatiana Souza Matos** e **Mateus Pontes Fiuza** - pelo apoio que nos deram na realização desse trabalho.

26. Aos **Funcionários da Pós- Graduação Sra. Sônia Celino e Sr. Edney calazans** - Pela atenção e disponibilidade para nos auxiliar neste caminho.
27. À **Sr. Luciano Santos Coelho** - Funcionário do Hospital São Rafael, pelo apoio técnico na área de informática.
28. Aos **funcionários do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital São Rafael** – que de forma bastante prestativa colaboraram com a realização desse projeto.
29. À **Sra. Lúcia Maria José Cruz Alves** – Funcionária do serviço de Anatomia Patológica do Hospital Aliança que pacientemente colaborou com essa pesquisa.
30. À Todos aqueles que embora não citados nominalmente, também contribuíram de alguma forma para o nosso êxito.

# ÍNDICE

---

<b>SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>4</b>
<b>LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>9</b>
<b>I- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>II- REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>Hepatite pelo vírus C.....</b>	<b>15</b>
<b>II.1- Biologia Molecular .....</b>	<b>15</b>
<b>II.1.1- A estrutura Viral.....</b>	<b>15</b>
<b>Proteínas estruturais.....</b>	<b>16</b>
<b>Proteínas não estruturais.....</b>	<b>16</b>
<b>II.1.2- Heterogeneidade Genética.....</b>	<b>18</b>
<b>Genótipos.....</b>	<b>18</b>
<b>Distribuição Geográfica dos Genótipos .....</b>	<b>20</b>
<b>Quasiespecies.....</b>	<b>24</b>
<b>II.2- Patogênese .....</b>	<b>25</b>
<b>Mecanismos envolvidos na persistência da infecção .....</b>	<b>26</b>
<b>Mecanismos envolvidos nas lesões hepáticas.....</b>	<b>27</b>
<b>II.3- Epidemiologia.....</b>	<b>28</b>
<b>Transmissão.....</b>	<b>30</b>

Parenteral.....	30
Não Parenteral.....	32
II.4- História Natural.....	33
Determinantes de progressão da doença.....	38
Fatores relacionados ao vírus.....	38
Fatores relacionados ao hospedeiro.....	39
Ação da sobrecarga de ferro no tecido hepático.....	40
Fatores externos.....	49
II.5- Diagnóstico.....	50
Testes Indiretos .....	51
Testes Diretos.....	54
As transaminases na avaliação da lesão hepática.....	58
Aplicação dos teste diagnósticos.....	59
Avaliação histológica hepática.....	61
II.6- Tratamento.....	69
III.....	ARTIGO
III.1-Resumo.....	75
III.2- <i>Abstract</i> .....	77
III.3- Justificativa.....	79
III.4- Objetivos.....	80
III.5-Material e Métodos.....	80

<b>III.5.1-Critérios de inclusão.....</b>	<b>81</b>
<b>III.5.2-Critérios de exclusão.....</b>	<b>82</b>
<b>III.5.3-Análise estatística.....</b>	<b>83</b>
<b>III.6-Resultados.....</b>	<b>84</b>
<b>III.7-Discussão.....</b>	<b>90</b>
<b>III.8-Perspectivas futuras.....</b>	<b>96</b>
<b>III.8- Conclusão.....</b>	<b>97</b>
<b>III.9-Referências.....</b>	<b>98</b>
<b>IV- Summary.....</b>	<b>102</b>
<b>V- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>104</b>
<b>VI- ANEXOS.....</b>	
<b>ANEXO 1-Documento de aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa.</b>	
<b>ANEXO 2-Normas para publicação do periódico para o qual o trabalho foi encaminhado e está sendo submetido a aprovação.</b>	
<b>ANEXOS 3 e 4- Abstract do trabalho que foi apresentado sob a forma de poster na Biennial Scientific Meeting of international association for the study of the Liver que ocorreu em Salvador – Bahia em Março de 2004</b>	

# SIGLAS E ABREVIATURAS

---

4

AA	Aminoácidos
AgHCV	Antígeno do vírus C da hepatite
ALT	Alaninaminotrasferase
Anti-HCV	Anticorpo anti Vírus da Hepatite C
CDC	Centro de Controle de Doenças
CHC	Carcinoma Hepatocelular
Cols	Colaboradores
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
ELISA-1	Ensaio Imunoenzimático de primeira geração
ELISA-2	Ensaio Imunoenzimático de segunda geração
ELISA-3	Ensaio Imunoenzimático de terceira geração
FLT	Ferro Ligado à Transferrina
FNLT	Ferro Não Ligado à Transferrina
HE	Coloração de Hematoxilina - Eosina
HFE	Gen da Hemocromatose
HAI	Índice de atividade histológica
HCV-RNA	RNA do vírus C da hepatite
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HSR	Hospital São Rafael
HUPES	Hospital Universitário Prof. Edgard Santos

HVR1	Região hipervariável 1
HVR2	Região Hipervariável 2
IFG	Instituto de Fígado e Gastroenterologia
IL	Interleucina
INF	Interferon
ISPR	Região determinante da sensibilidade ao interferon
MU	Milhões de unidade
n	Número de casos no estudo
NANB	Não A Não B( Referente ao vírus da Hepatite)
NASH	Esteato – Hepatite não alcoólica
NCR	Região não codificada
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NS	Não Estrutural
PCR	Reação de Cadeia Polimerase
PEG INF	Interferon Peguilado
PMN	Necrose em <i>piecemeal</i> (s-celada)
RNA	Ácido ribonucleico
RS	Resposta Sustentada
RVS	Resposta Viroológica Sustentada
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida



SRE	Sistema retículo endotelial ( <i>hepatite mononuclear</i> )
STD	Standard
TfR1	Receptor de Transferrina 1
Th1	Células T <i>helper</i> 1
Th2	Células T <i>helper</i> 2
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C

# LISTA DE TABELAS E FIGURAS

---

<b>Figura I:</b> Genoma do VHC com expressão das poliproteínas. Adaptada de G. Lauer e cols. ....	17
<b>Quadro I:</b> Vários sistemas de Classificação propostos para Genótipos HVC.....	19
<b>Quadro II:</b> Nomenclatura do VHC: Tipos e Subtipos de genótipos. Adaptado de Simmonds 1994.....	19
<b>Figura II:</b> Distribuição mundial dos genótipos e subtipos do vírus C: Adaptado de Nizar N. Zein 2000.....	21
<b>Quadro III:</b> Distribuição dos genótipos do VHC nos estados federativos Segundo Fórum Nacional da hepatite C no Brasil 1997.....	22
<b>Quadro IV:</b> Distribuição dos subtipos do VHC nos estados federativos Segundo o Fórum Nacional da hepatite C no Brasil 1997.....	22
<b>Figura III:</b> Distribuição dos genótipos do vírus C nas diferentes regiões Do Brasil.....	23
<b>Figura IV:</b> Mecanismos patogênicos da fibrose induzida pelo ferro. Adaptado de Pietrangelo 1998.....	44
<b>Quadro V:</b> Síndromes clínicas relacionadas à sobrecarga de ferro Adaptado de Trinder 2002.....	49
<b>Figura V:</b> Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na Na hepatite C.....	58
<b>Quadro VI:</b> Escore para Index de Atividade Histológica Adaptado de Knodell 1981.....	64
<b>Quadro VII:</b> Index de Atividade Histológica de Kondell modificada por Ishak em 1995.....	66
<b>Quadro VIII:</b> SISTEMA METAVIR 1996 Atividade inflamatória.....	67

<b>Quadro IX:</b> SISTEMA METAVIR 1996	
Graduação da fibrose.....	67
<b>Quadro X:</b> Classificação das Hepatites Crônica	
Sociedade Brasileira de Patologia .....	68
<b>Tabela 1:</b> Tabela descritiva das variáveis do estudo.....	86
<b>Tabela 2:</b> Descrição da relação sobrecarga de ferro e genótipo.....	86
<b>Gráfico 1:</b> Relação entre sobrecarga de ferro níveis de ALT.....	87
<b>Gráfico 2:</b> Relação entre presença de esteatose hepática e sobrecarga de ferro.....	87
<b>Tabela 3 :</b> Relação sobrecarga de ferro e fibrose hepática.....	88
<b>Tabela 4:</b> Relação sobrecarga de ferro e atividade inflamatória.....	88
<b>Gráfico 3:</b> Relação entre resposta terapêutica e sobrecarga de ferro.....	88
<b>Tabela 5:</b> Análise bivariada: sobrecarga de ferro e variáveis do estudo.....	89

Introdução: A sobrecarga de ferro é uma complicação em indivíduos com hepatite crônica, sendo considerada uma das causas para o desenvolvimento da cirrose. Esta condição está associada com o genótipo do vírus da hepatite crônica (VHC). Alguns estudos apontam para o papel dos aspectos genéticos, dentre eles, sobrecarga de ferro, que pode estar associada com o genótipo 1, mais frequentemente na presença de sobrecarga de ferro, quando este indivíduo é tratado com interferon Alfa. Alguns autores consideram que a sobrecarga de ferro está associada com a resposta à terapia. Objetivo: Avaliar a influência da sobrecarga de ferro sobre a evolução da doença em pacientes portadores de hepatite crônica, sobre a evolução da doença em sua resposta aos esquemas terapêuticos atuais é controversa.

**Objetos:** 1- Determinar a sobrecarga de ferro no tecido hepático em pacientes portadores de hepatite crônica na cidade de Salvador - Ba. 2- Correlacionar o genótipo do vírus encontrados nesses pacientes com a presença ou não de sobrecarga de ferro; 3- Correlacionar seus aspectos histológicos com a presença ou não de sobrecarga de ferro; 4- Avaliar as consequências da sobrecarga de ferro sobre a resposta ao tratamento com Interferon Alfa associado a Ribavirina nos pacientes. **Material e métodos:** Foram estudados 95 amostras de tecido hepático de pacientes portadores de hepatite crônica pelo vírus HCV procedentes de três centros de referência para doenças hepáticas da cidade de Salvador - Ba. Esses pacientes foram divididos em 2 grupos: Grupo I- presença de sobrecarga de ferro e Grupo II ausência de sobrecarga. A avaliação histológica foi feita através do Sistema METAVIR. Esses pacientes tinham média de idade de 45,75 anos (de 27 a 62 anos), 21,0% do sexo feminino. Dos 95 pacientes, 69 tinham determinação do genótipo com predominância 70,5% do genótipo 1. 85 pacientes foram tratados com a associação de Alfa Interferon e Ribavirina. Excluídos: Etílicos, associação com vírus B e/ou HIV, transfusão recente, pacientes com suspeita de hemocromatose, talassemia e hemofilia orgnotransfusas. **Resultados:** Trinta pacientes (31,58%) pertenciam ao grupo I. Houve um predomínio de sobrecarga de ferro no tecido

**Introdução:** A literatura tem mostrado que 85% ou mais dos indivíduos com hepatite aguda pelo vírus C (HCV) progride para a forma crônica e cirrose. Este último importante fator para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC). Alguns fatores influenciam a evolução desses pacientes, dentre eles estão: carga viral, genótipo do vírus, álcool, co-infecção (HIV,HBV) e, mais recentemente, a presença de sobrecarga de ferro poderia estar alterando a evolução desta infecção. Alguns autores têm observado que a sobrecarga de ferro está associada à baixa resposta à terapia com Interferon Alfa. Na literatura os dados relacionados a influência da sobrecarga de ferro no tecido hepático dos pacientes portadores de hepatite C sobre a evolução natural da doença e a sua resposta aos esquemas terapêuticos atuais é controversa.

**Objetivos:** **1-** Determinar a prevalência de sobrecarga de ferro no tecido hepático em pacientes portadores de hepatite crônica pelo Vírus C na cidade de Salvador-Ba. **2-** Correlacionar o genótipo do vírus encontrados nesses pacientes com a presença ou não de sobrecarga de ferro; **3-** Correlacionar seus aspectos histológicos com a presença ou não de sobrecarga de ferro. **4-** Avaliar as conseqüências da sobrecarga de ferro sobre a resposta ao tratamento com Interferon Alfa associado a Ribavirina nesses pacientes. **Material e métodos:** Foram estudadas 95 amostras de tecido hepático de pacientes portadores de hepatite crônica pelo vírus C procedentes de três centros de referência para doenças hepáticas da cidade de Salvador – Ba. Esses pacientes foram divididos em 2 grupos: **Grupo I-** presença de sobrecarga de ferro e **Grupo-II** ausência de sobrecarga. A avaliação histológica foi feita através do Sistema METAVIR. Esses pacientes tinham média de idade de 45,75 anos (de 27 a 62 anos), 25,26% do sexo feminino. Dos 95 pacientes: 69 tinham determinação do genótipo com predomínio de 70,1% do genótipo 1; 85 pacientes foram tratados com a associação de alfa-interferon e ribavirina. Excluídos: Etilistas, associação com vírus B e/ou HIV, hemotransfusão recente, pacientes com suspeita de hemocromatose, talassemia e hemofilia diagnosticadas. **Resultados:** Trinta pacientes (31,58%) pertenciam ao grupo I. Houve um predomínio de sobrecarga de ferro no tecido

hepático dos pacientes do sexo masculino em relação ao sexo feminino (36,62% X 16,67% respectivamente), porém sem significância estatística  $p=0,069$ . Na avaliação do genótipo: o ferro esteve presente em 28,57% dos pacientes genótipo 1 comparados a 30% dos pacientes genótipo não 1 ( $p=0,906$ ). Em relação às alterações histológicas a sobrecarga de ferro não influenciou no grau de atividade inflamatória ( $p=0,47$ ) mas notamos, em termos percentuais, uma tendência a sobrecarga de ferro nas amostras com grau de atividade mais intensa (29,27% em A0, A1 e A2 quando comparado com 46,15% em A3 e A4). Em relação à fibrose hepática, entretanto, houve uma predominância estatisticamente significativa nos pacientes com fibrose mais intensa quando comparado aos quadros mais leves de fibrose (4,35% em indivíduos com F0/F1 na classificação de METAVIR, 41,18% em estágios F2 e F3, 38,1% em estágios F4)  $P= 0,005$ . Quanto à resposta terapêutica não houve no presente estudo diferença estatisticamente significativa entre a presença de sobrecarga de ferro no tecido hepático e a resposta ao tratamento com interferon e ribavirina (28,57% dos pacientes que tiveram resposta sustentada à terapêutica tinham sobrecarga de ferro comparados a 32,14% dos pacientes que não responderam à terapêutica) ( $p=0,73\%$ ). **Conclusão:** A prevalência de sobrecarga de ferro nos pacientes portadores de hepatite C em nosso meio foi de 31,58% no nosso estudo, não houve diferença estatisticamente significativa em relação a sexo, idade, níveis de ALT, genótipo, atividade inflamatória e resposta à terapêutica, entretanto observamos uma maior predominância de sobrecarga de ferro nos pacientes com fibrose mais intensa.

**Palavras Chaves:** Hepatite C, sobrecarga de ferro, genótipo, atividade inflamatória, fibrose, resposta terapêutica.



# INTRODUÇÃO

## I-INTRODUÇÃO

---

A literatura tem notificado que 85% ou mais dos indivíduos com hepatite aguda pelo vírus C (VHC) progride para a forma crônica e <sup>?</sup> cirrose sendo este último um <sup>?</sup> importante fator para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC) (BENVEGNI, 2004). Estudos sobre a história natural dessa doença apresentam estimativas variadas devido às dificuldades na sua realização, já que o quadro agudo é raramente identificado, a infecção crônica é freqüentemente assintomática e a duração da doença é prolongada. Entretanto, há evidências indicando que a doença progride lentamente. Num período de 30 anos, aproximadamente 20% dos indivíduos infectados desenvolvem fibrose e cirrose e desses cerca de 20% evoluirá para CHC (SEEFF, 1999). Alguns fatores, sabidamente, influenciam a evolução desses pacientes, dentre eles estão: <sup>c</sup> Carga viral, genótipo, álcool, co-infecção (HIV, VHB) (SEEFF, 1999). <sup>e</sup> E, mais recentemente, a presença de sobrecarga de ferro.

O papel do ferro nas hepatites virais vem se tornando assunto de interesse nos últimos anos. Os índices de ferro sérico estão freqüentemente elevados em tais doenças e essa elevação pode alterar o curso da infecção pelo Vírus C, seja facilitando a replicação viral, seja estimulando a progressão para fibrose e cirrose, conseqüentemente aumentando o risco de CHC (BEINKER, 1996). Por outro lado, alguns autores têm observado que a sobrecarga de ferro está associada à baixa resposta à terapia com Interferon Alfa (IKURA, 1996), e, estudos sugerem que a



remoção do excesso de ferro por repetidas flebotomias pode ser de benefício terapêutico para o tratamento de pacientes com hepatite crônica pelo vírus C (TSAI, 1997).

Embora possamos observar freqüentemente índices de ferro sérico elevados nas hepatites virais, não podemos utilizar os marcadores séricos para determinar o status de ferro hepático já que não existe correlação entre soro e histologia. Na infecção pelo vírus C, através de avaliação sorológica, estima-se uma freqüência de 40% de sobrecarga de ferro enquanto à histologia observamos uma positividade em torno de 10%.(RIGGIO, 1997).

Os mecanismos que levam a sobrecarga de ferro nos pacientes com hepatite C permanecem desconhecidos. Dentre os propostos estão a liberação pelo hepatócito lesado, lesão relacionada a um efeito do próprio vírus ou a possível coexistência de hemocromatose levando a elevação dos parâmetros de ferro nesses pacientes (DIBISCEGLIE, 1992) .

Muitos estudos têm sugerido uma associação entre hepatite crônica pelo vírus C e hemocromatose. Pela determinação de ferro hepático e cálculo do índice de ferro no tecido ou teste de genotipagem para hemocromatose estima-se que 10% dos pacientes com hepatite C e B com índice elevado de ferro tecidual tenham hemocromatose genética. Recentemente duas mutações nos genes (designadas HFE) que são responsáveis por hemocromatose genética foram observados. Uma resulta da substituição da tirosina por uma cisteína na posição 282 da proteína HFE (C282Y), que

é responsável por 64 a 91% dos casos de hemocromatose genética nos Estados Unidos e alguns países europeus (PIPERNO,1998) e a outra mutação, cujo papel ainda é controverso, ocorre pela substituição da histidina pelo ácido aspártico na posição 63 (H63D).

No Brasil estima-se que cerca de 1,23% da população adulta é portadora do vírus C da hepatite o que torna essa entidade um importante problema de saúde pública. Diante da elevada prevalência de portadores de Vírus C na nossa população e evidências do papel da sobrecarga de ferro na evolução desses pacientes, faz-se necessário um maior conhecimento do comportamento evolutivo dessa infecção associada aos índices de ferro no tecido hepático.

# REVISÃO DE LITERATURA

# REVISÃO DE LITERATURA

## II- REVISÃO DE LITERATURA

---

O Vírus da hepatite C (VHC) infecta um número estimado em 170 milhões de pessoas em todo mundo o que é cinco vezes mais freqüente do que a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 ( HIV1) (LAUER, 2001) . A progressão para infecção crônica ocorre na maioria dos indivíduos, principalmente se adultos e do sexo masculino. Alguns pacientes desenvolvem hepatite crônica com evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular. A hepatopatia crônica pelo vírus C corresponde a uma das principais indicações de transplante hepático (PRINCE, 2002) o que justifica a busca de conhecimento no que diz respeito à estrutura, evolução, comportamento epidemiológico da infecção além de identificar possíveis esquemas terapêuticos eficazes na tentativa de interromper a progressão da doença.

## HEPATITE PELO VÍRUS C

### II.1- Biologia molecular

#### 1.1.1- Estrutura viral

O VHC está classificado no gênero da família *Flaviviridae* que compreende os gêneros *Flavivirus* como o vírus da Dengue, da Febre Amarela (MIYAKAWA, 1997) e o *Pestivirus*. Atualmente admite-se um novo gênero na família *Flaviviridae* denominado *hepacivirus* no qual insere-se o VHC.

Desde a década de 70 tem-se conhecimento da existência de outro vírus relacionados à hepatites Não-A Não-B (NANB) (ZUKHERMAN, 1989). Posteriormente foi observado que o vírus C era responsável por 85% das hepatites pós - transfusionais por agentes NANB.

O VHC foi isolado experimentalmente em 1989, nos Estados Unidos, e o seu genoma apresenta uma fita simples de RNA, de polaridade positiva, composta por cerca de 9500 nucleotídeos (CHOO, 1989). Possui uma Região Aberta de Leitura ("Open Reading Frame") que codifica uma grande poliproteína composta por cerca de 3000 AA (aminoácidos) que, quando processada por enzimas do vírus e do hospedeiro, origina 10 proteínas classificadas como estruturais e não estruturais ou reguladoras (Fig. I). Estas são flanqueadas, em ambas terminações por regiões não

codificadas (NCR ou UTR, do inglês *non-coded region* ou *untranslated region*) 5' e 3' com 342 e 60 nucleotídeos de comprimento, respectivamente. A região UTR 5' apresenta um sítio de entrada interna para ribossomoso, o que pode ter um importante papel regulador durante a replicação viral, talvez no início da tradução (TSUKIAYAMA, 1992). A região UTR 3' está, provavelmente, também associada ao início da replicação de RNA (LOHAMANN, 1996).

### **Proteínas estruturais:**

A organização genômica do VHC mostra que os componentes estruturais incluem as proteínas do capsídeo - *core* e duas glicoproteínas do envelope E1 e E2 (gp 35 e gp 70 respectivamente) além de uma pequena proteína conhecida como p7. No envelope E2 existem duas regiões designadas regiões hipervariáveis 1 e 2 (HVR1 e HVR2) que possuem uma taxa extremamente elevada de mutações, principalmente a HVR1. A proteína E2 parece também possuir um sítio de ligação com a proteína CD81, uma tetraspanina expressa nos hepatócitos e linfócitos B que pode funcionar como um receptor celular ou co-receptor para o vírus da hepatite C (PILERI P, 1998).

### **Proteínas não estruturais:**

O VHC também codifica as seguintes proteínas não estruturais (NS): região não estrutural 2 (NS2), região não estrutural 3 (NS3), regiões não estruturais 4A (NS4A) e 4B (NS4B) e as regiões não estruturais 5A (NS5A) e 5B (NS5B). A proteína NS2 corresponde a uma protease de serina. A NS3 possui propriedades de uma protease e de uma helicase, enzima envolvida no processo de replicação viral. Na região NS5A foi

descrita uma seqüência de nucleotídeos sugerida como um determinante da sensibilidade do vírus ao interferon (ISDR do inglês "*Interferon Sensitivity Determination Region*") (ENOMOTO, 1996) que afetaria a resposta a esta droga nos pacientes com hepatite crônica, entretanto este dado não foi confirmado por outros autores. A região NS5B, por sua vez, codifica o RNA polimerase e o RNA dependente, enzima responsável pela replicação viral (LOHAMANN,1996). As regiões NS3 e NS5B representam potenciais alvos para futuras terapias anti-virais. (PILERI,1998) e (KOLYKHALOV, 2000).

O tamanho da região que codifica a poliproteína varia conforme o genótipo do vírus de 3008 a 3037 AA.

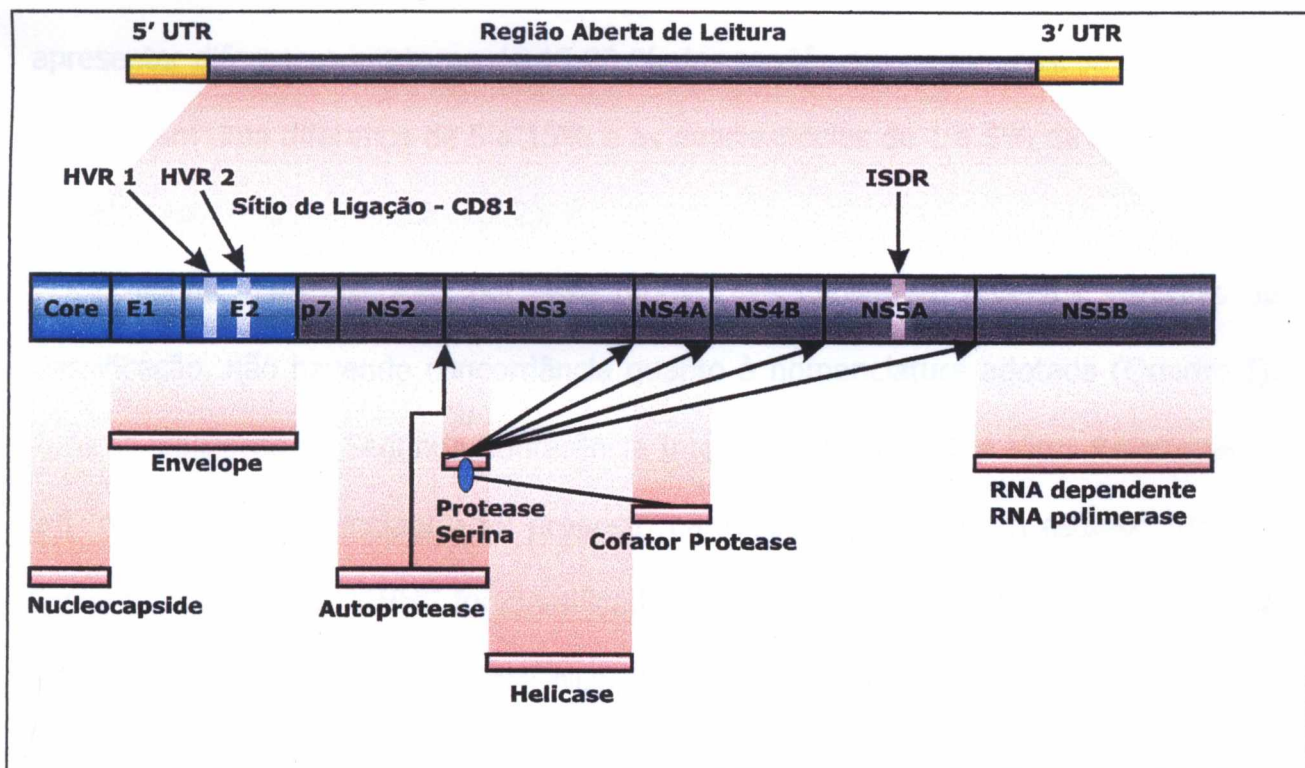


Figura I- Genoma do VHC com expressão das poliproteínas. Adaptada de G. LAUER e cols, 2001.

### ***1.1.2-Heterogeneidade genética***

#### **Genótipos:**

Após o genoma completo ter sido determinado por Choo e cols. em 1991, muitos isolados do VHC de diferentes regiões geográficas foram obtidos e seqüenciados. Verificou-se que o vírus C possui um elevado grau de heterogeneidade genética com uma freqüência estimada de 1,4 a 1,9 X 10<sup>-3</sup> mutações de nucleotídeos por ano (BASSIT & SAÉZ-ALQUÉSAR, 1995), o que determina a presença de grupos heterogêneos do vírus. Consequentemente, o vírus foi classificado em vários genótipos e subtipos. Diferentes genótipos podem refletir diferenças em torno de 30- 35% do genoma viral, enquanto que diferentes subtipos de um mesmo genótipo podem apresentar diferenças em torno de 15-20 % das seqüências genômicas. Já os isolados apresentam uma diferença de 5 a 15% e as quasiespecies de 1 a 5% da seqüência de nucleotídeos. (HOOFANAGLE, 2002).

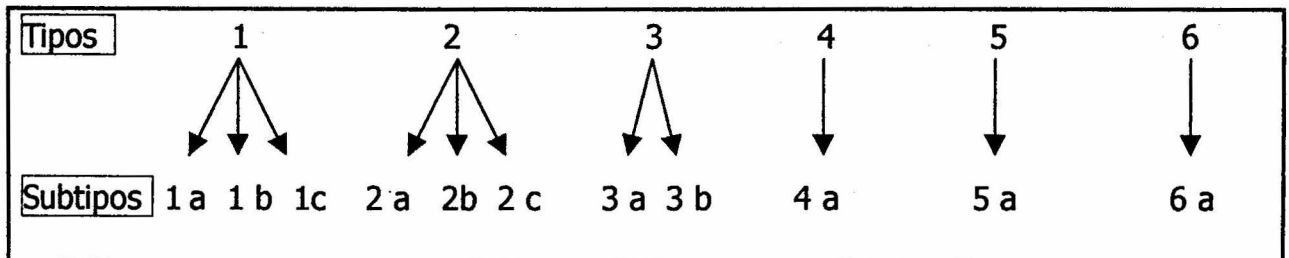
Alguns investigadores, por esse motivo desenvolveram diversos sistemas de classificação, não havendo concordância quanto à nomenclatura adotada (Quadro I). Após a realização da Segunda Conferência Internacional do VHC e Vírus Relacionados um sistema de nomenclatura foi proposto para ser empregado em estudos futuros. Segundo o Consenso o VHC foi classificado em vários genótipos agrupados em pelo menos 6 tipos e 11 subtipos (SIMMONDS, 1994), (quadro II).



Quadro I-Vários sistemas de Classificação propostos para Genótipos HVC. Adaptado de Zein N, 2000

Okomoto e Cols.	Enomoto e Cols.	Simmonds e Cols.	Cha e Cols.	Consenso ( Simmonds e Cols.)	Exemplos Isolados
I	PT	1a	I	1a	HVC-1, HVC-H
II	K1	1b	II	1b	HVC-J, HVC-JT,HVC-BK
				1c	HC-G9, YS-117
III	K2a	2a	III	2a	HC-J6, HC-J5, HVC-K2a
IV	K2b	2b	III	2b	HC=-J8, HC-J7,HVC-K2b
			III	2c	S-83, T-983
V		3	IV	3a	HVC-K3a, T-1, T-7
VI			IV	3b	HVC-TR, T-9,T-10
		4		4a	Z4, Z8, Z5, Syr1, Syr2,N5,Cam600, Z1, N1,N2,DK13
				5a	SA-1, SA-7
			V	6a	HK-2

Quadro II. Nomenclatura do VHC: Tipos e Subtipos de genótipos. Consenso 1994. Adaptado de Simmonds 1994

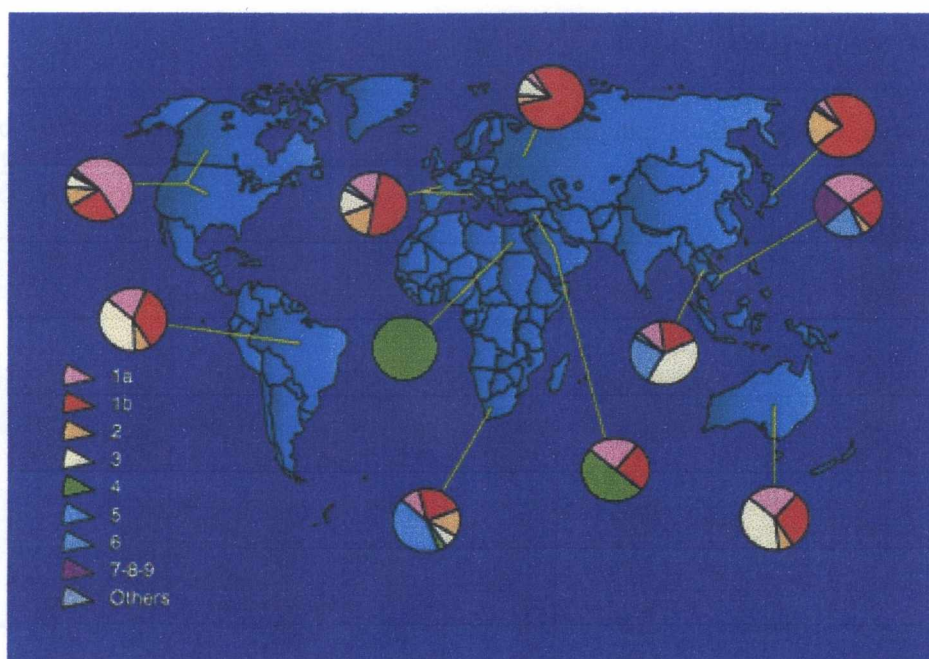


- **Distribuição Geográfica dos Genótipos do VHC:**

A distribuição dos genótipos é variável de acordo com as regiões geográficas (Figura II). Embora os genótipos 1, 2 e 3 tenham uma distribuição universal, sua prevalência relativa varia de uma área geográfica a outra. Os subtipos 1a e 1b são os genótipos mais comuns nos Estados Unidos e na Europa (ZEIN, 1996), (DUSHEIKO, 1994). No Japão o subtipo 1b é responsável por mais de 73% dos casos de hepatite pelo vírus C. O subtipo 2b prevalece no norte da Itália mas o genótipo 3a é particularmente prevalente em usuários de drogas intravenosas na Europa e Estados Unidos (PAWLITSKY, 1995). Já o genótipo 4 foi descrito no Norte da África e no Oriente Médio (ABDULKARIM,1998), ( CHAMBERLAIN, 1997) e os genótipos 5 e 6 na África do Sul e Hong Kong respectivamente (CHA, 1992), ( SIMMONDS, 1993). Os genótipos 7, 8 e 9 foram identificados apenas em pacientes vietnamitas (TOKITA, 1994), os genótipos 10 e 11 foram observados na Indonésia (TOKITA, 1996). Existem discordância quanto à classificação do número de genótipos, entretanto predominou o critério que os genótipos de 7 a 11 corresponderem a variantes do mesmo grupo e classificados como um único genótipo - tipo 6 ( MELLOR ,1996), (TOKITA, 1998).

No Brasil alguns estudos foram desenvolvidos para determinar a distribuição dos genótipos do vírus C entre grupos distintos de indivíduos. Muitos desses estudos demonstram uma alta prevalência do genótipo 1 seguidos pelos genótipos 3 e 2 (Figura III) (BUSEK,2003).

Em São Paulo, foi demonstrado que o genótipo 1b é o mais freqüente entre doadores de sangue ( 52%), seguido dos subtipos 1a (20%), 3a (20%), 2a(4%) e 2b(4%) (BASSIT, 1994). No Rio de Janeiro também se observa predomínio do genótipo 1 (STUYVER, 1995). Os quadros III e IV apresentam a distribuição dos genótipos e subtipos de acordo com os estados federativos apresentado no Fórum Nacional de hepatite C no Brasil em 1997. A determinação do genótipo em cada região têm relevância visto que ensaios clínicos revelaram que a resposta ao tratamento com interferon e ribavirina inferior nos pacientes com genótipo 1 (MCHUTCHISON, 1998), ( POYNARD, 1998).



**FiguraII:** Distribuição geográfica mundial dos genótipos e subtipos do vírus C da hepatite. Outros" significa seqüência não classificada: Adaptado de Nizar N. Zein ( Clinical microbiology Reviews abril de 2000, vol. 13, Nº 02)

Quadro III: Distribuição e prevalência dos genótipos do VHC segundo estados federativos (retirado do Fórum Nacional da hepatite C no Brasil 1997).

<b>Genótipo</b>	<b>Estado %</b>			
	<b>Amazonas</b>	<b>R. de Janeiro</b>	<b>São Paulo</b>	<b>R. G. do Sul</b>
1	73,1	88,5	69,9	50,3
2	3,8	0,7	8,0	8,8
3	15,5	8,6	23,2	40,9
4	3,8	-	-	-
5	3,8	-	-	-
6	-	-	-	-

Quadro IV: Distribuição e prevalência dos subtipos do VHC segundo estados federativos (retirado do Fórum Nacional da hepatite C no Brasil 1997).

<b>Sub-tipos</b>	<b>Estado %</b>			
	<b>Amazonas</b>	<b>R. de Janeiro</b>	<b>São Paulo</b>	<b>R. G. do Sul</b>
1 a	26,9	39,55	28,85	-
1 b	46,2	48,95	42,10	-
2 a	-	-	4,0	-
2 b	3,8	0,7	4,0	-
3 a	15,5	8,6	23,2	-

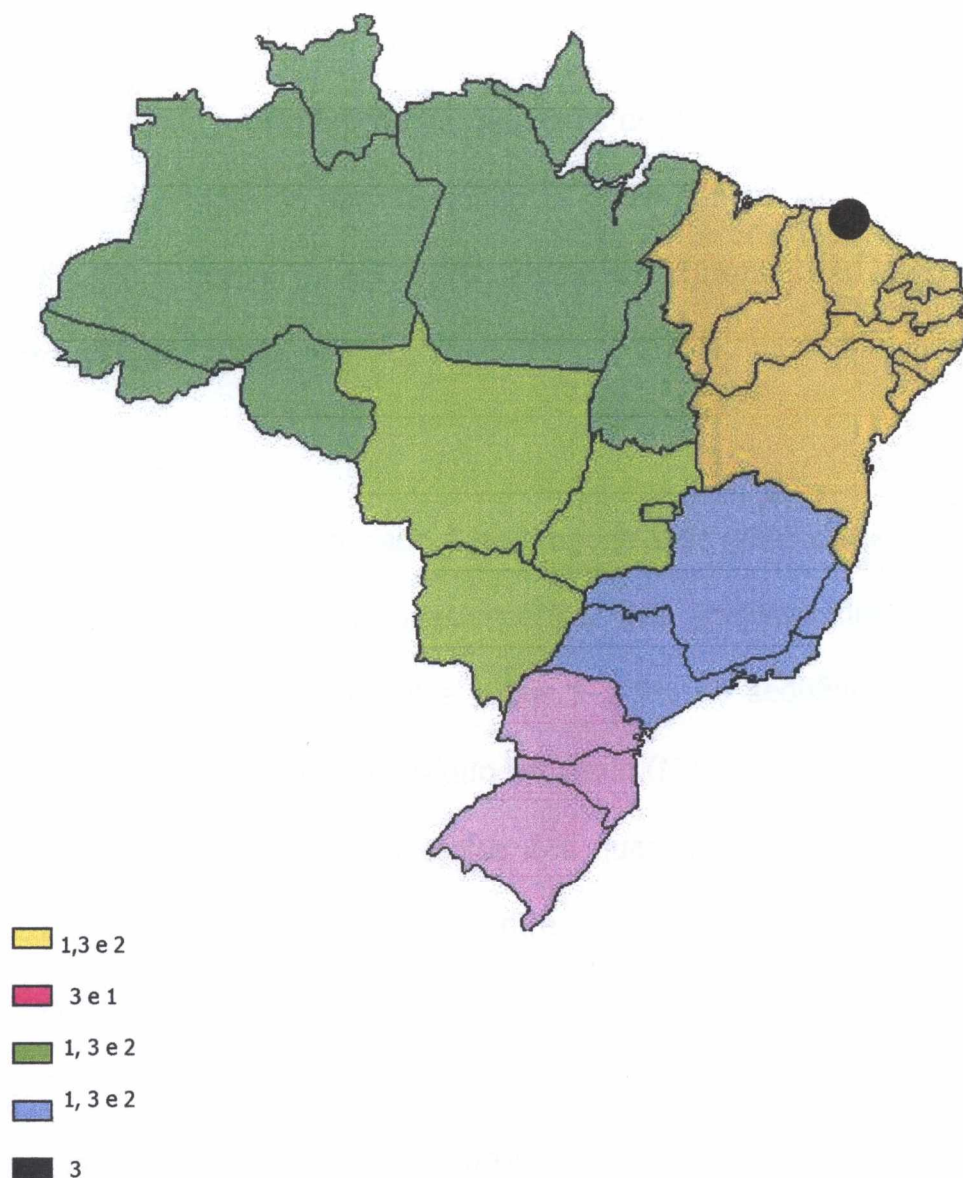


Figura III: Distribuição dos genótipos do vírus C nas diferentes regiões de Brasil. Nas regiões norte, nordeste e suldeste o genótipo 1 é mais freqüente, seguido pelos genótipos 3 e 2. Na região sul o genótipo 3 é o mais freqüente seguindo-se o genótipo 1. Uma maior prevalência do genótipo 3 foi observada de forma isolada no estado do Ceará. Adaptado de Busek - 2002.

Na Bahia a distribuição de genótipos do vírus C se assemelha à distribuição da maioria das regiões do país: Genótipo 1a ocorrendo em cerca de 24%, 1b em 38,5%, 2 em 3,5%, genótipo 3a em 21,7% e 12% dos pacientes são infectados por genótipos mistos (SILVA, 2000).

### **Quasiespecies:**

Um outro aspecto associado à heterogeneidade genética do vírus é que ele circula como uma população de quasiespecies, que correspondem a genomas do VHC semelhantes, que diferem entre si por 1 a 5% na seqüência de nucleotídeos e são encontrados em um único indivíduo infectado (MARTELL, 1992).

A presumível importância clínica das quasiespecies vem do fato de que alguns estudos sugerem uma correlação entre uma maior heterogeneidade das quasiespecies, gravidade da doença hepática e pobre resposta à terapia com Interferon (GONZALEZ-PERALTA, 1996), (LE GUEN, 1997) e (PAWLOTSKY, 1998a). Alguns autores admitem que as quasiespecies estejam implicadas na evolução para cronicidade da infecção pelo VHC. (BOYER, 2000).

Observou-se também que uma menor heterogeneidade das quasiespecies é mais freqüentemente encontrada em pacientes com hepatite crônica com níveis de ALT normais quando comparado com pacientes com níveis séricos de ALT elevados (ASSELAH, 1999).

As conseqüências biológicas das quasiespecies incluem o aparecimento de mutantes que escapam da imunidade humoral e celular, variável tropismo celular, falência na obtenção de vacinas e rápido desenvolvimento de resistência a drogas (BOYER, 2000 ).

## **II.2- Patogênese**

A infecção pelo vírus C caracteriza-se por uma tendência a cronificação e por um espectro clínico amplo. Cerca de 55% de crianças ou mulheres jovens e 85% de adultos do sexo masculino infectados evoluem para infecção crônica (MARCELIN, 1999a). A apresentação clínica da doença tem uma variação bastante ampla, desde infecção crônica assintomática, com testes hepáticos normais e histologia com alterações mínimas, até hepatite crônica importante, levando rapidamente a cirrose e carcinoma hepatocelular.

Os mecanismos responsáveis pela persistência da infecção pelo VHC e pelas lesões hepáticas não são bem entendidos. A sua avaliação fica limitada pelas dificuldades de um sistema de replicação *in vitro* e das dificuldades de obter crescimento do VHC em meios de cultura (BOYER, 2000). Estudos em chimpanzés através de injeção de VHC RNA recombinante abrem uma perspectiva para obtenção de vacina. (KOLYKHALOV, 1997). Além disso, manipulações genéticas do virion RNA levaram a replicação viral em células derivadas de hepatócitos, criando possibilidades para a síntese de proteínas virais e melhor compreensão da patogênese da hepatite C (LOHMANN, 1999).

### **Mecanismos envolvidos na persistência da infecção:**

A qualidade da resposta imune celular é crucial para a eliminação ou a persistência da infecção. Células T, CD4+, e suas citocinas com atividades reguladoras parecem ter um importante papel na imunopatogênese desta infecção. As células T-*helper* 1 (Th1) secretam interleucina 2 (IL-2) e interferon gama, que são importante estímulo para o desenvolvimento de resposta anti-viral do hospedeiro, incluindo geração de linfócitos T citotóxicos e ativação de células *natural - Killer*. As células T-*helper* 2 (Th2) produzem IL-4 e IL-10, que aumentam a produção de anticorpos o que regula a resposta do Th1. A hipótese cogitada é que um desequilíbrio entre resposta de Th1 e Th2 esteja implicado na progressão da doença e inabilidade do hospedeiro livrar-se do vírus (BOYER, 2000).

Pacientes que apresentam hepatite aguda conseguem eliminar o vírus e têm uma hepatite autolimitada, desenvolvem uma resposta Th1 intensa, enquanto há uma resposta Th2 ausente ou débil. Contrariamente, os pacientes que apresentam uma doença crônica mostram predomínio de uma resposta Th2, mas uma resposta Th1 frágil (GONZÁLES-PERALTA, 1994).

A infecção pelo VHC também ocorre em células mononucleares do sangue periférico, monócitos e linfócitos. Além disso, a detecção de "*minus strand* RNA" em células hematopoiéticas sugere que este seja um possível sítio de replicação extra - hepático do VHC (LERAT, 1996), devendo ter um papel importante na persistência da



infecção viral, possivelmente alterando a resposta imune ou favorecendo a infecção das células hepáticas.

A produção de anticorpos é fundamental para neutralização das partículas virais livres prevenindo a entrada do vírus no hospedeiro. Estudos mostram que anticorpos neutralizantes são produzidos durante a infecção pelo vírus C, mas ausência de efetividade desses anticorpos pode ser explicada pelas rápidas mutações que o vírus desenvolve (BOYER, 2000). A frequência estimada de substituições de nucleotídeos é muito elevada:  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$  substituições por ano. Consequentemente num mesmo indivíduo infectado pelo VHC, a população viral consiste de uma mistura heterogênea de virions relacionados os quais variam entre eles de 1 a 9% das bases chamadas quasiespecies (BUKH, 1995).

### **Mecanismos envolvidos nas lesões hepáticas:**

O VHC não é diretamente citopático e as lesões hepáticas estão principalmente relacionadas a mecanismos imune mediados (BOYER, 2000). A infecção persistente pelo VHC no fígado dispara constantemente uma resposta ativa das células T, o que é provavelmente o principal mecanismo das lesões hepáticas. A predominante produção de citocinas Th1 parece ter um papel importante nas lesões necro-inflamatórias (GONZÁLES-PERALTA, 1994). Essas alterações necro-inflamatórias persistentes são, provavelmente, a principal causa de fibrogênese progressão da doença hepática.

## ***II.3- Epidemiologia***

O VHC é o agente predominante e provavelmente o único, da hepatite Não-A-Não-B por transmissão parenteral de sangue e derivados (WEINER, 1990). A partir da realização do primeiro teste sorológico, o anti-HCV, novos conhecimentos sobre a epidemiologia e caráter evolutivo da doença aguda e crônica foram adquiridos.

A infecção pelo vírus da hepatite C é universal e sua endemicidade é um pouco mais elevada em países em desenvolvimento.

### **Prevalência:**

Estima-se que 3% da população mundial está infectadas pelo vírus C da hepatite e que 90% dessas progredirão para doença crônica (ALTER, 1992a).

A prevalência da hepatite C é variável nas diversas regiões, com o maior número de infecções registrado no Egito. O uso de terapia parenteral contra esquistossomose nesse país provavelmente contribuiu para essa prevalência, numa percentagem que varia de a 15 a 20%, com média de 22% (FRANK, 2000).

Nos Estados Unidos uma extensa pesquisa conduzida entre 1988 e 1994 mostrou que 1,8% dos americanos são portadores de anticorpos contra o VHC e que 74% desses tem RNA viral detectável em seu soro (ALTER, 1999). Através dos testes disponíveis atualmente calcula-se que 2,7 milhões de pessoas nos Estados Unidos têm infecção ativa pelo VHC.

A taxa de prevalência entre doadores saudáveis varia de 0,1% a 0,2% no Reino Unido e no Norte da Europa (MUTIMER, 1995), 1 a 1,5% no sul da Europa

( ESTEBAN, 1989) , observando-se taxas mais altas, 6,5%, em algumas regiões da África Equatorial ( DELAPORTE, 1993) .

Doadores anti-HCV positivos chegam a 0,28% na França, 0,16% na Alemanha o 0,04% na Dinamarca (BOOTH, 2001).

#### Incidência:

Ao contrário da prevalência, a incidência de novos casos de infecção pelo VHC é muito mais difícil de estimar, já que a maioria dos casos agudos não é diagnosticada. Entretanto, o Centro de Controle de Doenças (CDC) estima que a incidência anual de hepatite aguda pelo vírus C nos Estados Unidos diminuiu de um número aproximado de 230.000 novos casos por ano na década de 80 para 38.000 novos casos por ano na década de 90 (RAY, 2002).

No Sul do Brasil a prevalência de anti-HCV entre doadores de sangue é de 1,1% ( BRANDÃO, 2002). Em São Paulo um trabalho realizado entre detentos mostrou uma alta prevalência de anticorpo anti-HCV nessa população chegando a 41% (GUIMARÃES, 2001). Na cidade de Salvador Santana registrou que 1,74% dos doadores de sangue eram anti-HCV positivos (SANTANA , 1995).

#### Mortalidade:

Métodos sofisticados foram desenvolvidos para estabelecer mortalidade e tentar determinar se a doença hepática é a causa ou contribui para a morte desses pacientes. Em um grande estudo realizado por Seeff onde foram incluídos todos os casos de hepatite NANB (n=568) de cinco estudos anteriores pareados

cuidadosamente com um grupo controle ( n=984) de pacientes transfundidos e que não desenvolveram hepatite num período de observação de 18 e 20 anos revelou que a taxa global de mortalidade foi semelhante em ambos os grupos, a frequência de mortalidade atribuída a doença hepática foi relativamente baixa (3,2%) entre os casos, mas foi significativamente mais alta (p=0,033) do que o grupo controle (1,5%). Importante registrar que dos pacientes desse estudo que presumivelmente morreram de doença hepática em ambos os grupos, 71% foram identificados como grandes etilistas ( SEEF, 1992). A presença de co-fatores como alcoolismo ou associação com HIV ou vírus B da hepatite são determinantes para agravamento da doença.

## **Transmissão:**

### **1. *Transmissão parenteral.***

A transmissão do vírus C ocorre principalmente por via parenteral, embora em um percentual significativo de casos não seja possível a identificação da via de infecção (ALTER, 1992a), (ROUDOT-THORAVALL, 1997). A instituição de medidas de triagem em sangue e derivados no início da década de 90, em países desenvolvidos, diminuiu o risco de hepatite associada a transfusão a níveis negligenciáveis. Atualmente, nos Estados Unidos, o risco do sangue anti-HCV negativo transmitir hepatite C é inferior a 1:103.000 unidades transfundidas( SCHIREIBER, 1996), com um risco residual relacionada às doações que ocorrem no intervalo entre a infecção e o desenvolvimento de anticorpos detectáveis estimada na janela imunológica de 12 semanas (LEGLER, 2000). Esse risco é quase a metade do risco de infecção

relacionada à transfusão com hepatite pelo vírus B(VHB) que é de 1:63.000 e aproximadamente 5 vezes o risco estimado da infecção por HIV-1 que é de 1:493.000 ( SCHIREIBER, 1996). O risco relacionado à transfusão, atualmente, é menor já que novos métodos de triagem diminuíram o período de janela imunológica para cerca de três semanas.

Uso de drogas intravenosas é o principal fator de risco para infecção pelo vírus C com percentual variando entre 50 e 100% de usuários de drogas anti-HCV positivo (BOOTH, 2001). O risco em hemofílicos chega a valores entre 60 e 80% (ALTER, 2000). Outras rotas de transmissão podem ser citadas: hemodiálise, cuja frequência descrita é de 15 a 30% (GILLI P, 1990) e (MONDELLI, 1990). No Brasil, na cidade de Salvador-Ba, foi observado uma soroprevalência de 23,8% em dialisados (SANTANA, 1995) Também observa-se prevalência alta no estado do Ceará com taxa de 52% (MEDEIROS,2004). Outras rotas de transmissão parenteral incluem: transplante de órgãos (PEREIRA, 1991), tatuagens, *piercing*' e práticas tradicionais comuns em alguns países como o uso de lancetas e agulhas não esterilizadas utilizadas em programas de imunização em larga escala. A transmissão da hepatite C também tem sido documentada após acidentes com agulhas contaminadas, resultando em transmissão nosocomial do vírus. O risco nesta população está em torno de 1,8% (KIYOSAWA, 1991), mas em outros estudos esta percentagem pode variar de 0 a 4% chegando a 10% se a fonte contaminante for HVC-RNA positivo (MITSUI, 1992). (HERNANDEZ, 1992). Comparativamente, o risco de contaminação por esse tipo de

acidente, pelo vírus B chega a 30% enquanto para o HIV-1 é de 0,3%. Devemos, entretanto considerar em acidentes por agulha o volume do inoculo, o calibre da agulha e a profundidade da penetração (LAUER, 2001).

## **2. *Transmissão não parenteral***

### **- Transmissão sexual:**

Estudos epidemiológicos mostram baixas taxas de infecção pelo VHC em grupos de alta promiscuidade como prostitutas, homossexuais e pacientes com doenças sexualmente transmissíveis (DST), sugerindo um papel limitado da transmissão sexual do vírus C (MELBYE, 1990), (TEDDER, 1991), (HESS, 1989). Em homossexuais HIV positivo cerca de 30% tem anti-HCV no soro e cerca 11,7% não relatavam história de transfusão ou uso de drogas ilícitas venosas sugerindo que a transmissão sexual ocorre e pode ser facilitada pela co-infecção com o HIV (WRIGHT, 1994). Por outro lado, não foi possível detectar VHC pela técnica de PCR em líquidos orgânicos como sêmen, urina, fezes e secreções vaginais (HSU, 1991). A taxa de positividade de anti-VHC parece ser baixa em parceiras de hemofílicos infectados a menos que haja infecção concomitante pelo HIV (SCARAGGI, 1993). O risco de transmissão em relações monogâmicas longas é de 5%, contudo múltiplos parceiros sexuais, presença de doença sexualmente transmissíveis e prostituição aumentam o risco de infecção pelo VHC (MESQUITA, 1997).

- Transmissão Vertical:

Apesar dos estudos serem controversos em alguns aspectos, a taxa de transmissão mãe - filho do VHC parece ser baixa a menos que a mãe seja HIV positivo ou tenha altos níveis de viremia. Nesta situação menos que 6% dos recém-nascidos são VHC positivos (OHTO, 1994). A amamentação não está implicada na transmissão do vírus C da hepatite e este não tem sido detectado no leite materno (OGASAWARA, 1993) .

Em Salvador –Ba, Paraná e cols., avaliando 232 portadores de vírus C, observou-se que 40% dos indivíduos tinham passado de hemotransfusão, 6% deles tinham história de uso de drogas intravenosas, 8% inalação de cocaína, 12% apresentavam tatuagem, 7% eram profissionais da área de saúde 2% havia reutilizado seringas, 2% tinha múltiplos fatores de risco e em 23% dos casos nenhum fator de risco fora determinado ( PARANÁ, 2000) .

## ***II.4- História Natural***

Algumas características inerentes ao vírus C da hepatite como seu curso clínico silencioso e ausência de identificação da infecção aguda na maioria dos casos limitam a avaliação da evolução natural desta doença. Resultados epidemiológicos relacionados à infecção Não-A Não-B, nas décadas de 70 e 80, forneceram importantes informações para caracterização da hepatite C. O período de incubação varia de 15 a 160 dias, com média entre 45 e 55 dias. Curtos períodos de incubação,

inferiores a 30 dias foram relatados em pacientes que receberam concentrados de coagulação.

O período de transmissão da doença inicia-se antes da elevação das aminotransferases, uma vez que, em chimpanzés, sangue obtido 12 dias antes do início da doença transmitiu a infecção (TABOR, 1978).

A hepatite C é classificada em aguda e crônica. O diagnóstico da hepatite aguda é poucas vezes identificado. As manifestações clínicas, na maioria das vezes, ocorrem dentro de 7 a 8 semanas após a contaminação com uma variação de 2 a 26 semanas. Embora sejam semelhantes às manifestações das hepatites por outros vírus hepatotrópicos, a apresentação clínica tende a ser mais leve e anictérica, a infecção subclínica é a regra com apenas 10% dos pacientes referindo uma sintomatologia aguda e icterícia. A hepatite fulminante é rara (FARCI, 1996), mas têm sido descritos casos raros de hepatite grave em pacientes transplantados. O HCV-RNA é detectado no sor, mais precocemente, cerca de 2 semanas após a exposição, enquanto o anti-HCV surge mais tardiamente, 1 a 2 meses depois. A resolução da hepatite aguda é caracterizada pelo clareamento do HCV-RNA e normalização das aminotransferases. Os pacientes que não eliminam o vírus desenvolvem hepatite crônica (HOOFNAGLE, 2002 ).

Existem dificuldades em determinar o tempo de evolução em que consideramos os pacientes vírus C positivos como portadores de hepatite crônica. Atualmente admite-



se como sendo a persistência do vírus por pelo menos 6 meses. O seu desaparecimento após um ano é excepcional.

Estudos prospectivos mostram que 85% dos pacientes adultos, do sexo masculino agudamente infectados (ALTER, 1999), desenvolvem infecção crônica, entretanto, crianças e mulheres jovens evoluem para cronificação em 45 a 50% dos casos. Desta forma, a depender do sexo e idade 15 a 45% dos indivíduos com infecção aguda evoluem para cura (ALTER, 2000). Alguns autores consideram que os pacientes que desenvolvem hepatite crônica são menos sintomáticos e desenvolvem menos icterícia na fase aguda da doença que aqueles que terão resolução da virose (GERLACH, 2001), (ALTER, 2000). Durante a fase aguda os títulos de aminotransferases podem flutuar e o HCV-RNA pode chegar a níveis indetectáveis, o que pode ser interpretado erroneamente como cura, sendo por isso, necessário o seguimento por 6 a 12 meses após negatização do HCV-RNA para confirmação que a infecção está resolvida (HOOFNAGLE, 2002). A hepatite crônica é com frequência assintomática, mas a depender do período evolutivo da doença os pacientes podem queixar-se de fadiga tipicamente intermitente (HOOFNAGLE, 1997) e às vezes desconforto no quadrante superior direito. Os níveis de ALT são encontrados desde constantemente elevados até flutuações inclusive com longos períodos de normalidade. Cerca de 1/3 dos pacientes apresentam-se com aminotransferases normais (CORNLY-CANTILENA, 1996). Nos pacientes com níveis séricos de ALT

persistentemente normais, a doença subjacente é freqüentemente leve e não progressiva, entretanto a evolução para cirrose pode ocorrer ( HABER, 1995) .

As principais complicações, a longo prazo, da hepatite pelo vírus C é a cirrose e o carcinoma hepatocelular (LIANG, 2000). A progressão para cirrose é muitas vezes silenciosa, alguns pacientes desconhecem serem portadores de vírus C até aparecerem manifestações de estágio final de doença ou hepatocarcinoma. Esforços têm sido feito para definir a freqüência e taxa de progressão para cirrose e CHC, as evidências mostram que a evolução da doença hepática não é observada nas duas primeiras décadas após a infecção aguda. Estudos retrospectivos mostram ao final de duas décadas cerca de 20% dos pacientes desenvolverão cirrose (SEEFF, 2002).

A existência de fatores de co-morbidades, como alcoolismo, infecções associadas como vírus B da hepatite ou Vírus da Imunodeficiência Adquirida aceleram a evolução para cirrose. O que diz respeito ao carcinoma Hepatocelular sabe-se que raramente ele se desenvolve em pacientes com hepatite crônica sem cirrose precedente ou fibrose significativa. Uma vez com cirrose, a taxa de evolução para o carcinoma hepatocelular é de 1 a 4% ao ano (SEEFF, 2002).

Outras complicações podem alterar de forma importante a qualidade de vida dos portadores de hepatite C. O vírus está associado a muitas manifestações extra-hepáticas, dentre elas estão: Crioglobulinemia mista essencial (crioglobulinemia tipo II) (PAWLOTSKY, 1994), que é a manifestação extra - hepática mais comum e que se caracteriza por fadiga "rush" cutâneo, disfunção renal, púrpura, artralgia e neuropatia.

A evolução natural da crioglobulinemia associada à hepatite C não está bem definida, mas pode levar a insuficiência renal progressiva e complicações relacionadas a vasculite. Embora os testes sorológicos mostrem que mais da metade dos pacientes portadores de hepatite C apresentam títulos baixos de crioglobulina a sintomatologia franca é rara ocorrendo em menos de 1% dos pacientes portadores de hepatite C. A crioglobulinemia responde ao tratamento com interferon muito embora exista tendência a recidiva quando a droga é interrompida (MISIANI, 1994). Para a confirmação da crioglobulinemia mista essencial é necessário a determinação do HCV RNA (AGNELLO, 1992). Linfoma não Hodgkin de células B, a maioria dos casos associados a crioglobulinemia ( ZUCKERMANN, 1997) , glomerulonefrite (JOHNSON 1993), artrite soronegativa, ceratoconjuntivite Sicca e sialoadenite ( HADDAD, 1992) , líquen plano, condições neurológicas incluindo disfunções cognitivas e neuropatias (HOOFNAGLE, 2002) e porfiria cutânea tarda, são complicações extra-hepáticas relacionadas ao vírus C da hepatite (BONKOVSKY, 1998). Questiona-se se além do tratamento anti-viral, a depleção de ferro através de flebotomias traria benefícios no tratamento da porfiria.

Além das patologias acima mencionadas é descrito associação da infecção pelo vírus C com hepatite auto-imune, tireoidite e poliarterite nodosa (LUNEL, 1994).

## **Determinantes de progressão da doença:**

Diferentes formas de evolução sugerem que existam variáveis que possam influenciar na velocidade de progressão da doença. São identificadas variáveis relacionadas ao vírus, ao hospedeiro e fatores externos:

### **Fatores relacionados ao vírus:**

1. **Carga viral:** Poucas evidências indicam que a carga viral influencia a progressão da doença. Permanece discutível se os níveis séricos de HCV-RNA tem relação com a gravidade da lesão hepática (MARTINOT - PEIGNOUX, 1995) e (ZEUZEM, 1996), uma vez que níveis elevados de HCV-RNA foram observados em pacientes com infecção crônica, aminotransferases normais e alterações histológicas mínimas (MARCELLIN, 1999a). Por outro lado, níveis de HCV-RNA refletem indiretamente replicação intra-hepática.
2. **Genótipo:** Inicialmente alguns autores consideraram que indivíduos com infecção pelo vírus C, genótipo 1b, evoluiriam mais rapidamente para cirrose e carcinoma hepatocelular que aqueles com genótipos 2 e 3 contudo esse estudos não foram confirmados por outros investigadores (SILINI, 1996) .
3. **Quasiespecies:** Ainda permanece em investigação o papel das quasiespecies na evolução da hepatite aguda, nos portadores infecção crônica e na resposta ao anti-viral (ZEIN, 1996).

### **Fatores relacionados ao hospedeiro:**

1. **Idade:** Um dos mais importantes determinantes da evolução da doença hepática pelo vírus C é a idade no momento da infecção. Muitos estudos têm enfatizado o papel da idade na infecção pelo vírus C. A hepatite crônica pelo vírus C é muito prevalente em pessoas idosas. Pacientes infectados com idade mais avançada têm lesões histológicas mais graves e evolução mais rápida para cirrose (TONG, 1995), enquanto crianças pouco evoluem para cirrose. Não estão estabelecidos os mecanismos responsáveis por essa relação principalmente no que diz respeito a resposta imune e fibrogênese.

2. **Sexo e raça:** É relatado que as mulheres têm uma taxa de evolução mais lenta do que os homens. Poynard e cols propuseram um modelo preditor de evolução de fibrose hepática de acordo com três fatores: idade, sexo e álcool. Esse modelo prever uma evolução para cirrose num período médio de 13 anos para homens infectados após os 40 anos de idade e um período de 42 anos para mulheres infectadas antes dos 40 anos na ausência de ingestão de álcool (POYNARD, 1997). A doença é mais rapidamente progressiva em homens acima de que 40 anos com ingestão alcoólica igual ou superior a 50g de etanol/dia. A evolução mais grave e mais rápida em indivíduos do sexo masculino sugere influência de fatores hormonais (TONG, 1995) (ALTER, 1992a).

### **Ação da sobrecarga de ferro no tecido hepático:**

#### **Metabolismo do ferro:**

A homeostase do ferro no organismo humano é controlada pela sua absorção a partir da dieta. Esta absorção ocorre principalmente no duodeno numa taxa de aproximadamente 1 a 2 mg ao dia. Quando os níveis de ferro no corpo ou na dieta estão baixos, a taxa de absorção do ferro é aumentada. O ferro é encontrado na dieta sob a forma de ferro iônico e não - iônico, ambos com mecanismos de absorção diferentes. O ferro iônico está presente no estado reduzido - ferro ferroso e no estado oxidado - ferro férrico e este deverá ser reduzido através de uma enzima chamada redutase para que ocorra a absorção. No estado ferroso o ferro é então transportado da luz intestinal através da superfície apical da vilosidade e transferido através da membrana basal para o plasma ( TRINDER, 2002).

O mecanismo de absorção do ferro não - iônico não está elucidado, ele é transportado através da membrana em escova. Acredita-se que sua absorção seja mediada por um receptor, mas este ainda não foi identificado ( TRINDER, 2002).

A regulação da absorção do ferro é determinada por alguns fatores, dentre eles o nível do ferro corporal, a eritropoiese e a hipoxemia. Eritrócitos localizados na região das criptas da mucosa duodenal retiram ferro do plasma na proporção dos níveis do metal no corpo e o nível de ferro intracelular reflete o *status* de ferro corporal. Nas células da cripta também encontramos proteínas como o receptor de transferrina 1 (TfR1) que regula a absorção do ferro ligado à transferrina (FLT) (ANDERSON, 1990),

e a proteína da hemocromatose (HFE) que junto com a  $\beta 2$  microglobulina formam um complexo que controla a transferência de ferro. Existe um segundo receptor de transferrina encontrado em baixos títulos no duodeno que não interage com o HFE cujo papel na absorção do ferro não está determinado( TRINDER, 2002). A atividade da proteína reguladora do ferro (PRF), um dos reguladores centrais também localizada nas criptas, reflete o status de ferro no corpo. Ela participa da regulação da expressão dos transportadores de ferro e da quantidade de ferro absorvida.

#### Mecanismos moleculares da sobrecarga de ferro :

O fígado é um grande sítio de armazenagem de ferro em condições de sobrecarga e o maior depósito ocorre nos hepatócitos sob a forma de ferritina ou hemosiderina. Na sobrecarga de ferro a taxa de absorção deste metal excede a sua taxa de excreção pelo hepatócito resultando no aumento dos seus níveis hepáticos. Usualmente o ferro é transportado no plasma pela transferrina. Contudo na sobrecarga de ferro a transferrina torna-se saturada com ferro e seu excesso não ligado a esta proteína torna-se elevado. O hepatócito pode absorver ambos, ferro ligado ou não à transferrina e ambas as fontes podem contribuir para o elevado depósito de ferro hepático na sobrecarga de ferro (TRINDER, 2002).

A alta concentração de ferro pode resultar em dano hepatocelular, fibrose e cirrose. O ferro não ligado à transferrina (FNLT) é extremamente tóxico, pode gerar radicais livres e é, normalmente, eliminado pelo fígado de forma rápida. A absorção de ferro ligado à transferrina (FLT) é feita através do receptor 1 de transferrina expresso

na cripta e o ferro não ligado à transferrina é absorvido através de um processo que envolve redução e transporte do ferro através da membrana por proteínas específicas.

O mecanismo de excreção do ferro do hepatócito não está bem esclarecido mas a ferroportina, uma proteína localizada na membrana do hepatócito, é uma provável candidata a este papel. O ferro é, então, oxidado pela ceruloplasmina e ligado à transferrina no plasma (TRINDER, 2002).

A proteína HFE não é expressa no hepatócito e, provavelmente, não tem um papel na regulação do transporte de ferro no hepatócito ( NASTIN, 1998) .

Recentemente o peptídeo antimicrobiano hepático hepcidina foi identificado como um mediador em potencial do metabolismo de ferro. Seu papel na homeostase não está claro, mas sabe-se que ela pode atuar como uma molécula sinalizadora que regula os níveis de ferro hepático e sua taxa de absorção (TRINDER, 2002).

#### Mecanismos de lesão hepática induzida pelo ferro:

A fibrose hepática é considerada uma resposta comum do fígado a insultos crônicos como infecções virais, abuso de álcool e sobrecarga de metais levando a dano celular e/ou necrose seguida de depósito excessivo de componentes da matriz extracelular no fígado causada por um desequilíbrio entre produção e degradação dessas substâncias. A matriz extracelular é composta de macromoléculas pericelulares insolúveis organizadas na membrana basal ou no interstício que interagem com muitas células: colágenos intersticiais ( tipos I, III, V e VI),



glicoproteínas não colagenosas e proteoglicanos (SCHUPPAN, 1992). Os componentes da matriz extracelular modulam a diferenciação e a função das células do parênquima e, por essa razão, têm um papel importante no desenvolvimento hepático, regeneração, fibrose e carcinogênese ( PIETRANGELO, 1998).

Os estudos relacionados aos mecanismos de lesão hepática têm avaliado o colágeno e observa-se que o depósito de ferro no hepatócito é necessário para a expressão do gen do colágeno ( GUALDI, 1994) , sugerindo que o depósito de ferro no hepatócito libera, diretamente, substâncias profibrogênicas as quais ativam células estreladas hepáticas- principal fonte celular de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular importantes na doença hepática crônica ou, podem ainda, atuar de forma indireta, liberando componentes que estimulam as células de Kupffer a produzir substâncias fibrinogênicas e estas ativam células estelares hepáticas ( PIETRANGELO, 1998).

As evidências mostram que o ferro pode catalisar a formação de oxi-radicais e dois importantes radicais podem resultar dessa reação: radicais lipídicos e radicais hidroxila. Este último é extremamente reativo e pode lesar muitos constituintes da célula. Da mesma forma os estudos mostram que a sobrecarga de ferro pode induzir a peroxidação lipídica das membranas orgânicas levando a lesão e morte celular. Os produtos da peroxidação lipídica estimulam produção de colágeno em células estelares hepáticas ativadas e fibroblastos humanos ( MAHER, 1994) .

A sobrecarga desse metal pode levar ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular que pode resultar de danos ao DNA induzido pelo ferro através da lesão cromossômica ou pela proliferação das células hepáticas de tronco chamada "células ovais" (LOWES, 1999).

A doença hepática associada a sobrecarga de ferro é o protótipo da lesão fibrótica relacionada ao estresse oxidativo. Conceitualmente poderemos considerar diferentes mecanismos patogênicos para o potencial fibrogênico do ferro (Fig. IV):

- 1) Ferro como um mediador fibrogenético direto por necrose hepatocelular conhecido como sideronecrose;
- 2) Ferro como um indutor de fibrogênese *per se* na ausência de necrose- Estudos mostram que o ferro tem efeito fibrogênico por si próprio independentemente da necrose (PIETRANGELO, 1996);
- 3) Ferro como co-fator na fibrogênese na conjunção com outras hepatotoxinas (co-iniciador e muitas vezes propagador da fibrogênese);

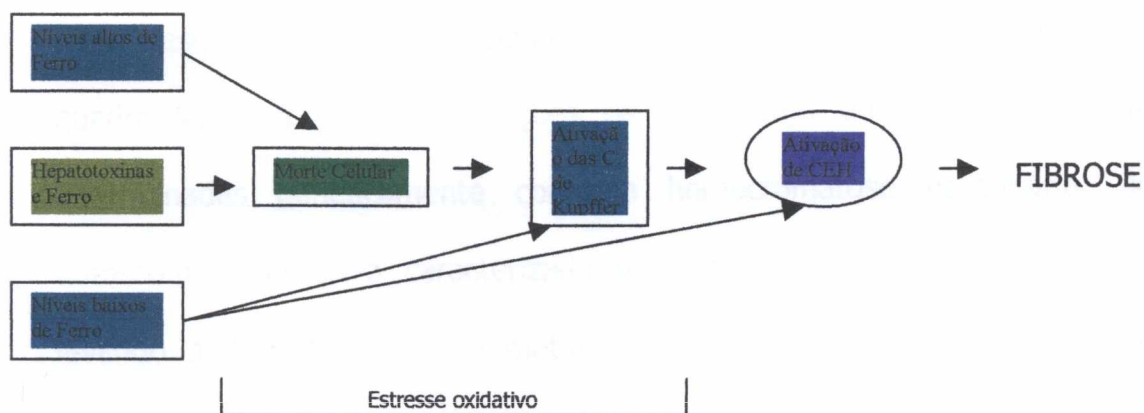


Figura IV.: Mecanismos patogênicos da fibrose induzida pelo ferro.  
CEH= Células estelares hepáticas.  
Adaptado Antonelo Pietrangelo J of Hepatology 1998

### Ferro como elemento fibrogênico direto da células de Kupffer:

As células do sistema reticuloendotelial (SRE), particularmente as células de Kupffer, exercem um papel central na fibrogênese hepática associada à sobrecarga de ferro. Nas células do SRE circula uma grande quantidade de ferro provenientes da lise das hemácias. Nas células de Kupffer o oxigênio é produzido durante a atividade fagocítica o que pode levar a formação de radicais oxidativos. Quando estimuladas, as células de Kupffer podem representar um importante mediador da fibrogênese. Neste contexto podemos considerar diferentes cenários( PIETRANGELO 1998):

- 1) Necrose hepatocelular e ativação das células de Kupffer, seguida de sobrecarga de ferro nas células do parênquimas.
- 2) Necrose hepatocelular e ativação de células de Kupffer seguida de sobrecarga de ferro nas células de Kupffer.

### Aspectos clínicos da sobrecarga de ferro:

As desordens clínicas relacionadas à sobrecarga de ferro estão descritas no quadro V. As principais condições de sobrecarga de ferro em humanos são determinadas geneticamente como a hemocromatose hereditária, desordem autossômica recessiva caracterizada por um defeito no metabolismo do ferro levando a sobrecarga desse metal em alguns órgãos como fígado coração e pâncreas. Frequentemente resulta de uma mutação no gen HFE. A primeira e mais freqüente é a mutação na posição Cisteína - Tirosina que é o C282Y encontrado

em 85 a 90% dos pacientes portadores de hemocromatose. A segunda mutação- H63D- foi identificado mas numa frequência mais baixa do que a mutação C282Y.

A hemocromatose inicialmente foi implicada como a responsável pela presença de sobrecarga de ferro no tecido hepático de pacientes portadores de hepatite pelo vírus C, entretanto os estudos mostram uma frequência um pouco superior a 10% dos pacientes com hepatite crônica pelo vírus C, que apresentam sobrecarga desse metal, tem associação com hemocromatose genética, portanto, a mutação HFE contribui mas não explica completamente o acúmulo de ferro na hepatite C (DIBISCEGLIE,1992) e ( PIPERNO, 1995).

Recentemente vem-se estudando a influência da sobrecarga de ferro nos casos de esteato-hepatite não alcoólica (NASH) no desenvolvimento de fibrose, principalmente naqueles pacientes sem Diabetes Mellitus, não obesos e homens (GEORGE,1998), entretanto alguns trabalhos questionam esta associação (DANTAS,2002).

#### Sobrecarga de ferro e resposta terapêutica no tratamento das hepatites virais:

A relação entre parâmetros anormais de ferro hepático e hepatite viral é conhecido há quase de 30 anos. A avaliação dos níveis séricos de ferro foi descrita inicialmente com hepatite B ( SUTNIK, 1974). Posteriormente estudos mostraram maior concentração de ferro hepático em pacientes portadores de hepatite viral crônica que não responderam a terapêutica com interferon comparados com os pacientes que responderam ao tratamento (VAN THIEL, 1994) e (OLYNYK, 1995) e

esses achados levaram a considerar que os pacientes poderiam se beneficiar da depleção do ferro excessivo através de repetidas flebotomias antes do tratamento com interferon ou antes de novo tratamento em pacientes previamente não respondedores. Alguns estudos foram publicados revelando uma redução nas taxas de ALT nos pacientes submetidos a flebotomias, entretanto não houve evidências consistentes de alguma mudança nos níveis de RNA ( PIPERNO,1996), ( HAYASHI, 1994). Embora existam inúmeras publicações considerando uma influência negativa da sobrecarga de ferro na resposta terapêutica o assunto ainda é bastante controverso visto que muitos autores não puderam confirmar esses achados (HOFER, 2004). Não está claro os mecanismos pelos quais o ferro interfere na resposta ao interferon, uma variedade de efeitos imunológicos e virológicos da sobrecarga e deficiência de ferro são conhecidos mas não são capazes de responder a esta questão. Também não estão definidos os mecanismos que levam a sobrecarga de ferro no tecido hepático de pacientes portadores de hepatite C. A concentração de ferro hepático parece diminuir de forma considerável após o tratamento com interferon  $\alpha$  o que sugere que a presença de sobrecarga de ferro hepático em pacientes com hepatite crônica pode ser resultado do grau de atividade inflamatória (BOUCHER, 1997) . Outra hipótese tenta explicar a sobrecarga de ferro através da descoberta do gen MHC classe 1 ( HLA-H) implicado com causa responsável pela hemocromatose ( FEDER, 1996) . É conhecido que o interferon interfere na regulação das proteínas desse gen

diminuindo absorção do ferro pelo fígado o que poderia explicar a diminuição na concentração de ferro hepático nos pacientes tratados com o anti-viral, entretanto esses mecanismos não estão elucidados e mais estudos são necessários para esclarecer a sobrecarga de ferro no tecido hepático e suas implicações na resposta terapêutica.

#### Ferro e neoplasia hepática:

Estudos experimentais e em humanos apoiam o papel carcinogênico do ferro. O ferro não ligado à transferrina, uma forma altamente reativa do ferro especialmente presente em condições de sobrecarga de ferro pode atuar como estimulador da produção de radicais livres e espécies oxigênio - reativas que por sua vez podem iniciar e promover a carcinogênese. Por outro lado o ferro ligado a transferrina , forma fisiológica, está propenso a facilitar o crescimento tumoral e ambas as formas pioram a função dos macrófagos e linfócitos (DEUGNIER, 1998) .

Quadro V: Síndromes clínicas relacionadas à sobrecarga de ferro  
Adaptado de Trinder 2002

Síndromes clínicas relacionadas à sobrecarga de ferro
<p>1- Formas familiares ou hereditárias de hemocromatose:</p> <p>a) Hemocromatose hereditária (HH, HFE1)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Homocigoto para a mutação C282Y</li> <li>• Heterocigoto para C282Y, H63D</li> <li>• Outras mutações genéticas do HFE</li> </ul> <p>b) Hemocromatose juvenil ( HFE2)</p> <p>c) Mutação do receptor de transferrina 2 ( HFE3)</p> <p>d) Mutação da ferroportina(HFE4)</p> <p>e) Aceruloplasminemia</p> <p>f) Atransferrinemia</p> <p>g) Sobrecarga de ferro neonatal</p> <p>h) Hemocromatose autossômica dominante ( Ilhas de Salomon)</p>
<p>2- Sobrecarga de ferro adquirida</p> <p>a) Anemias com sobrecarga de ferro</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Talassemia</li> <li>• Anemia sideroblástica</li> <li>• Anemias hemolíticas crônicas</li> </ul> <p>b) Sobrecarga de ferro na dieta</p> <p>c) Doenças crônicas de fígado</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hepatite C</li> <li>• Esteatohepatite não alcoólica</li> <li>• Porfiria cutânea tarda</li> </ul>

### **Fatores externos:**

**1. Álcool:** O álcool é um importante co - fator na evolução da doença hepática pelo vírus C. Em indivíduos que progridem para cirrose ou hepatocarcinoma, o álcool tem papel fundamental, através de mecanismos que resultam em replicação viral, alteração da complexidade das quasiespecies, aumentando a morte celular, supressão da resposta imune e sobrecarga de ferro ( VENTO, 2002). Poynard afirma que um consumo diário maior que 50g/etanol, está associado com uma evolução progressiva para fibrose (POYNARD, 1997) .

## **2. Co-infecção com o Vírus da hepatite B e com o Vírus da imunodeficiência adquirida (HIV):**

Estudos ambispectivos e prospectivos verificaram que a co-infecção viral com o vírus B da hepatite ou com o vírus HIV aceleram e agravam a hepatopatia dos pacientes com infecção C. Nesta situação a necrose hepática é mais pronunciada, assim como a resposta ao tratamento anti-viral é menos eficiente. Muitas vezes estes pacientes apresentam-se descompensados quanto a hepatopatia, contra-indicando o uso de interferon( MATHEWS, 2003).

## **II.5-Diagnóstico**

O vírus C foi clonado e seqüenciado em 1989 o que permitiu o desenvolvimento de testes diagnósticos eficazes para o rastreamento da hepatite C, mas os exames para detecção desse vírus só se tornaram disponíveis comercialmente a partir de 1992.

Duas categorias de testes são usadas no manejo dos pacientes infectados pelo VHC: testes indiretos que detectam anticorpos do VHC; e os testes diretos que detectam, quantificam ou caracterizam os componentes da partícula viral. Ambos, testes virológicos diretos ou indiretos têm um papel fundamental no diagnóstico da infecção, esquema terapêutico e avaliação da resposta viral ao tratamento (PAWLITSKY, 2002).



## **Testes Indiretos – testes sorológicos:**

### **1- ELISA**

O teste de triagem sorológico para infecção por VHC é feito pelo método de ensaio imunoenzimático. Foram desenvolvidas três versões consecutivas deste método que resultaram num aumento progressivo da sensibilidade do mesmo. A primeira versão, O ELISA de primeira geração ( ELISA-1), detecta anticorpos contra epitopos da porção C100-3 do VHC, tendo sido abandonado devido à baixa relação sensibilidade/especificidade (cerca de 80%) e a demora para positivar na fase aguda (até 24 semanas) ( KUO, 1989). Os mais correntemente usados, o ELISA de segunda geração (ELISA-2) e o de terceira geração (ELISA-3) empregam não só antígenos da região *core* ( C-22) como as proteínas não estruturais NS3 - NS4 e NS3, NS4 e NS5 respectivamente( VERNELEN, 1994) e (COUROUCE, 1994). O teste ELISA 3 tem sensibilidade especificidade de 99% ( ALTER, 1992b) ou ( PAWLOTSKY, 1998b). (PAWLOTSKY, 2002). O ELISA-3 diminui o tempo médio de soroconversão para 2 a 3 semanas( BARRERA, 1995). Em populações de baixo risco o teste falha em 0,5 a 1% dos casos ( VRIELINK 1997). Os ensaios imunoenzimáticos podem mostrar resultados falsamente positivos principalmente em pessoas sem fatores de risco ou sinais de doença hepática crônica como doadores de sangue, trabalhadores em avaliações periódicas. E, de outra forma, podem apresentar-se falsamente negativos em pacientes com comprometimento imunológico, como infecções pelo vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), o HIV-1 (CRIBIER, 1995) pacientes com

insuficiência renal e nos casos de crioglobulinemia mista essencial associada ao VHC (AGNELLO, 1992). Devido a essas raras reações não específicas nos testes de triagem pelo método de ELISA em excepcionais situações pode-se recorrer a testes confirmatórios como o RIBA por *imunoblot*.

## **2- RIBA**

Trata-se de um teste *imunoblot* no qual antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos são imobilizados em faixas de nitrocelulose ou tiras de nylon. Os anticorpos do VHC, se presentes, reagem às faixas de antígenos correspondentes e os complexos resultantes são revelados por um segundo. (ROGGENDORF, 1996) . Este teste foi desenvolvido para confirmação de resultados de ELISA positivos. Assim como o ELISA, gerações do RIBA aperfeiçoaram a técnica aprimorando sua sensibilidade, dessa forma, o RIBA 1 contém antígenos C100-3, 5-1-1 e da superóxido desmutase, enquanto o teste de segunda geração foi desenvolvido com antígenos do nucleocapsídeo (C22) e NS3 ( C33) adicionados os antígenos do RIBA de primeira geração. Estudos sugerem que o RIBA 2 permite uma detecção mais precoce da infecção pelo HVC na fase aguda e uma maior positividade na infecção crônica (MCHUTCHINSON, 1992), (DOURAKIS, 1992) . Um resultado positivo do RIBA de segunda geração está associado a uma viremia do VHC confirmada pelo PCR em 88 a 98% dos casos. (FOLLETT, 1991), ( NAKATSUJI,1992). O RIBA de terceira geração incorpora C22 e C100 -3 sintéticos, C33 recombinante e um antígeno NS5

recombinante no lugar 5-1-1. Esta última versão mostrou-se positiva em muitos casos de RIBA-2 indeterminado ( WICKI, 1993) e (PAWLOTSKY, 1993) além de ter uma melhor correlação com a viremia do VHC (MARTINOT-PEIGNOUX, 1993). Entretanto apesar da melhora da sensibilidade dos *immunoblot* com o RIBA-3, resultados indeterminados tem sido observados com a presença de HCV-RNA em 58% desses casos (LAMORIL, 1994). Dessa forma pacientes com resultados de RIBA-3 indeterminados deve ser avaliado quanto a possibilidade de replicação viral. Embora seja considerado teste confirmatório, a sensibilidade do RIBA assemelha-se à do ELISA ( PAWLOSTKY, 1998b). Os *immunoblots* são utilizados para confirmar a presença de anticorpos contra o VHC nas amostras ELISA-positivo. Segundo Pawlostky os testes confirmatórios não adicionam informações quanto a presença de anticorpos em amostras positivas pelo ELISA. A situação pode, entretanto, ser diferente em condições especiais como triagem de doadores de sangue porque nesta população testes de triagem positivos estão freqüentemente associados a testes immonoblot negativos (SAYERS, 1993). Para pacientes com doença hepática o RIBA tem uma taxa de confirmação de 90%, já em doadores de sangue essa taxa cai para 50% (GOFFIN, 1994) (DOW, 1994). Na prática médica não há necessidade de utilização dos testes confirmatórios de RIBA.

### **3-Testes Diretos:**

#### **3.1-Reação de cadeia polimerase - PCR**

O RNA viral, por sua vez, pode ser identificado no soro, poucas semanas após a exposição ao vírus, através do método reação em cadeia da polimerase (PCR), e a sua presença indica replicação viral e infecção ativa (SHIMIZU, 1990). Inicialmente, o PCR para o vírus C usava precursores de regiões não-estruturais heterogêneas do vírus. O desenvolvimento de precursores de regiões não codificadas altamente conservadas 5' aumentou a capacidade de detecção do vírus C pelo método de PCR (GARSON, 1990). Este método é útil para determinação da carga viral, portanto, importante para monitorização da terapia anti-viral. Todos os pacientes com anticorpo positivo ou sob risco de infecção pelo vírus C, a despeito de testes sorológicos negativos devem testar o PCR no soro. Um resultado positivo confirma viremia corrente, enquanto um teste negativo pode significar: infecção não virêmica, ausência transitória de viremia ou infecção resolvida (BOOTH, 2001). Os testes diretos utilizam a Reação em Cadeia Polimerase para investigação da hepatite pelo vírus C. Estes testes podem ser assim definidos:

### **3.2- Detecção qualitativa do VHC-RNA:**

É um teste que indica a presença e replicação do vírus. Tem como princípio básico amplificação do alvo usando ou o PCR ou o TMA (amplificação mediada por transcrição. Os menores "*cutoffs*" detectáveis nos métodos disponíveis são de 50 unidades internacionais do HCV-RNA e 10 unidades internacionais do VHC-RNA por ml ( UI/ml), respectivamente. Sua especificidade é de 98 a 99%. ( PAWLOSTKY, 1998b).

### **3.3-Quantificação da Carga Viral:**

A carga de HCV-RNA pode ser quantificada pelas principais técnicas de amplificação (PCR ou TMA) ou por técnicas de amplificação de sinais ( "*Branched*" DNA). Os limites inferiores de detecção de "*cutoff*" dos testes disponíveis variam entre 30UI/ml e 615UI/ml e os limites superiores de quantificação estão entre 500,000 UI/ml e 7,700,000 UI/ml. Amostras com cargas virais mais altas devem ser retestadas após diluição de 1/10 ou 1/100. A avaliação da carga viral não depende do genótipo (PAWLOTSKY, 2000) .

### **3.4-Genotipagem:** (Determinação molecular do genótipo do VHC)

Outra forma de avaliação que seria o exame padrão e mais definitivo é o seqüenciamento de uma porção amplificada-PCR específica do genoma do VHC obtida do paciente, seguida da análise filogenética, contudo este teste é impraticável em larga escala devido à complexidade do procedimento( ZEIN, 2000). Outros métodos dependem principalmente da amplificação do HCV-RNA seguido por reamplificação

com primers tipo-específicos, hibridização com probes tipo-específicos (QU, 1994) ou pela digestão de produtos do PCR ( McOMISH, 1993). Outros testes baseados no PCR existem, mas, embora todos eles sejam capazes de identificar corretamente o grupo genotípico principal, apenas seqüenciamento de nucleotídeo direto é eficiente na discriminação de subtipos ( SIMMONDS, 1995) .

### **3.5-Detecção e quantificação do antígeno *core* total do VHC:**

Ainda sob observação devido a dados insuficientes, o antígeno core total (AgHCV) pode ser detectado e quantificado através de testes imunoenzimáticos, os seus títulos – expressos em pg/ml – correlacionam-se proximamente dos níveis de HCV-RNA e dessa forma postula-se que possa ser usado como marcador indireto de replicação viral, contudo, a versão atual deste exame não é capaz de detectar o HCV-RNA quando os títulos são inferiores a aproximadamente 20000 UI/ml (PAWLOTSKY, 2000).

Na prática clínica o que podemos observar é que a presença de um teste ELISA positivo em paciente portador de doença crônica de fígado é provavelmente suficiente para o diagnóstico de infecção pelo vírus C e testes confirmatórios( RIBA) não são habitualmente necessários. Avaliação do RNA viral pela técnica de PCR é recomendada nesses pacientes.

Consensualmente pacientes com suspeita de hepatite pelo vírus C deverão ser testado para o anti-HCV pelo ELISA de terceira geração. Todos os pacientes anticorpo

positivo e aqueles com anti-HCV negativo, mas com risco de infecção pelo vírus C devem ser submetidos a dosagem do HCV-RNA no soro. Os testes de immunoblot (RIBA) são habitualmente indicados em pacientes que se apresentam com ELISA positivo, entretanto o PCR revela-se negativo ( BOOTH, 2001).

A detecção do anti-VHC indica, na maioria dos casos, presença de infecção ativa pelo vírus, entretanto, pode corresponder também a uma infecção passada que evoluiu para cura. Portanto, o anti-HCV não distingue infecção aguda de infecção crônica. Até o momento não há um anticorpo da classe IgM com sensibilidade e especificidade suficientes para identificar infecção aguda pelo VHC. Na hepatite aguda, o anti-HCV sérico é detectado cerca de um a dois meses após a exposição ao vírus (figura V). O RNA viral, por sua vez, pode ser identificado no soro poucas semanas após à exposição ao vírus, através do método reação em cadeia da polimerase (PCR), e a sua presença indica replicação viral e infecção ativa (SHIMIZU,1990).

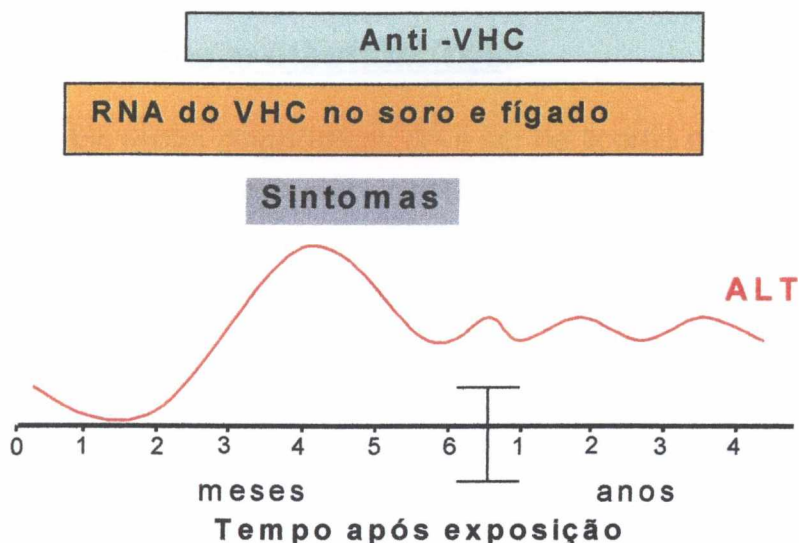


Figura V.: 02 Representação esquemática dos eventos clínicos e sorológicos na hepatite C.

### **3. As transaminases na avaliação da lesão hepática:**

A avaliação dos níveis de aminotransferases para triagem de infecção pelo vírus C é de valor limitado, visto que 50% dos pacientes infectados pelo vírus tem níveis normais dessas enzimas, além disso, os resultados dos testes hepáticos de rotina correspondem pobremente com atividade inflamatória e fibrose observados em espécimes de tecido hepático (ALBERTI, 1992). A determinação dos níveis de aminotransferases tem sido utilizada, atualmente, para triagem de pacientes candidatos à terapêutica para a infecção pelo vírus C. Pacientes com aminotransferases em níveis  $\geq$  a 1,5 o limite superior do normal e portadores de infecção pelo vírus C, são encaminhados para biópsia hepática afim de que sejam alocados para tratamento.



## **5. Aplicação dos teste diagnósticos:**

O uso dos testes diagnósticos deve ser de acordo com o cenário clínico:

### **A- Na infecção aguda:**

Durante um quadro clínico de hepatite aguda cuja etiologia não é conhecida deve-se solicitar o Anti-HCV pelo ELISA e o HCV-RNA. a detecção do anti-HCV indica, na maioria dos casos, presença de infecção ativa pelo vírus, entretanto, pode corresponder também a uma infecção passada que evoluiu para cura. Portanto, o anti-HCV não distingue infecção aguda de infecção crônica. Até o momento não há um anticorpo da classe IgM com sensibilidade e especificidade suficientes para identificar infecção aguda pelo VHC. Na hepatite aguda, o anti-HCV sérico é detectado cerca de um a dois meses após a exposição ao vírus o que dificulta o seu diagnóstico precoce. A presença do HVC-RNA na ausência do Anti-HCV é , entretanto fortemente indicativo de hepatite aguda pelo vírus C, um diagnóstico que poderá ser confirmado quando houver a soro conversão. Na ausência dos dois marcadores o diagnóstico de hepatite aguda é improvável. Na presença de ambos é difícil determinar se, trata-se de um quadro agudo ou uma agudização de um paciente cronicamente doente, ou, ainda de uma infecção aguda por outra causa num paciente portador de hepatite crônica pelo vírus C. (PAWLOTSKY, 2000).

**B- Na infecção Crônica:**

Em pacientes com doença crônica de fígado o diagnóstico de hepatite C é feito pela detecção do anti-HCV confirmada pela positividade do HCV-RNA. A ausência anti-HCV na presença de HCV-RNA é incomum em pacientes portadores de hepatite C que são imunocompetentes, mas pode ocorrer em imunossuprimidos ou em pacientes com doença renal crônica em programa de hemodiálise (PAWLOTSKY, 2000) .

**C- Na transmissão vertical:**

O diagnóstico de infecção pelo vírus C no recém-nascido deverá ser realizado através do HCV-RNA ao invés do uso do anti-VHC, já que anticorpos são passivamente transferidos *in utero* e permanece detectáveis por muitos meses até mais de um ano. O momento ideal para a realização do teste de HCV-RNA não está bem determinado. Provavelmente entre o 6º e o 12º após o nascimento( PAWLOTSKY, 2002).

**D- No diagnóstico da infecção após uma exposição ocupacional:**

O HCV-RNA é detectável cerca de 2 semanas após uma exposição parenteral acidental. O diagnóstico deve ser baseado na detecção do HCV-RNA que pode ser realizado em algum momento após a primeira semana da exposição, geralmente após o primeiro ou segundo mês. O tratamento anti-viral não é emergencial nessas circunstâncias. A maioria dos autores prefere iniciar o tratamento depois do terceiro

mês de exposição, principalmente se crianças ou mulheres jovens, uma vez que a eliminação espontânea ( cura) ocorre em cerca de 45% nestes casos.

## **6- Avaliação histológica hepática:**

A biópsia hepática é utilizada como padrão-ouro para a determinação do estágio e grau de atividade na hepatite crônica pelo vírus C e é de grande importância na avaliação da indicação e dos efeitos do tratamento dessa patologia ( BESSODA, 1996).

É freqüentemente feita em paciente com evidências de infecção crônica pelo vírus C com aminotransferases anormais que são considerados para a terapia anti-viral, ou, quando existe dúvida em relação a outras possibilidades diagnóstica. A sua indicação na avaliação dos pacientes portadores de hepatite pelo vírus C com aminotransferases normais não está definida na literatura.

### **Achado Histopatológicos na Hepatite crônica pelo vírus C:**

O diagnóstico de hepatite crônica é baseado na avaliação separada do trato portal, interface mesênquima/parênquima, especialmente na região periportal e no parênquima lobular. Linfócitos são as células inflamatórias predominantes na hepatite crônica. Inflamação linfocítica confinada ao trato portal, caracteriza uma hepatite que não mostra tendência à progressão para cirrose. Na inflamação predominantemente periportal, o infiltrado linfocítico estende-se além da interface mesênquima/

parênquima (Lâmina limitante) caracterizando a necrose em "piecemeal" (necrose em saca-bocado).

A infecção crônica pelo vírus C está associada com alterações típicas de hepatite crônica incluindo necrose hepatocelular, inflamação e fibrose. Enquanto a atividade da doença hepática crônica pode flutuar muitas vezes / o estágio de fibrose, (e.) acredita-se, pode ser progressivo e irreversível. Na hepatite crônica C a frequência ? com que a fibrose progride é variável. Em alguns indivíduos a fibrose leva a cirrose, o que está associado com complicações importantes da doença hepática como hipertensão portal, falência hepática e carcinoma hepatocelular. Em outros, por outro lado, a fibrose não parece progredir após décadas de infecção. Por essas razões, avaliação do estágio e rapidez de progressão da fibrose pode ser útil em determinar o prognóstico e a necessidade de terapia. Fatores associados com fibrose não são bem definidos e o papel da atividade necroinflamatória é ainda controverso.

#### Sistemas de classificação morfológica:

Habitualmente o curso da hepatite crônica pelo vírus C é lento, com alterações inflamatórias leves. Contudo mesmo em casos assintomáticos de hepatite C, tem-se descrito episódios de maior atividade inflamatória, associados com necrose em "piecemeal" extensa e necrose em ponte centro-portal que podem acelerar o curso da doença (FISHER, 1996). Por essa razão a antiga classificação morfológica de "hepatite crônica persistente" perde seu valor preditivo, porque ela implicaria em um bom prognóstico sem evolução para cirrose hepática (LUDWIG, 1993) e (DESMED, 1994).

Além das limitações da classificação anterior e diante da importância da biópsia hepática no manejo dos pacientes portadores de hepatite crônica pelo vírus C, a reprodução do diagnóstico patológico entre os patologistas tornou-se fundamental para uma linguagem homogênea e com uma menor margem de variação na interpretação dos dados da amostra. Pela importância do assunto, a classificação da hepatite crônica viral passou a ser foco freqüente de debates. Adicionando-se à essa classificação de hepatite crônica persistente, crônica ativa e crônica lobular usada por mais de 20 anos (POPPER 1971) um sistema de avaliação histológica foi inicialmente proposto por Knodell e colaboradores em 1981. Trata-se de um sistema onde as alterações histológicas são organizadas em quatro categorias: Necrose periportal, necrose intralobular, inflamação portal e fibrose que geram um escore numérico que compõem o Índice de Atividade Histológica (HAI do inglês *Histology Activity Index*) (KONDELL, 1981) (Quadro VI). O HAI é simples e tem sido largamente utilizado, particularmente em grandes ensaios multicêntricos de terapia com interferon e ribavirina, para hepatite crônica pelo vírus C. Entretanto, a reprodutibilidade inter e intra-observadores do HAI, apesar de mais sistematizada ainda não é a ideal e a distinção entre os estágios 1 e 3 pode ser difícil, além disso sua escala descontínua complica a análise estatística em ensaios clínicos (MARCELIN, 2002) Em 1995 Ishak modificou o sistema criado por Knodell (ISHAK , 1995). O sistema de escore proposto por Ishak é mais sensível na avaliação da fibrose. Os estágios de fibrose são

organizados de modo contínuo de 0 a 6 o que permite uma melhor avaliação dos efeitos da terapia sobre a fibrose( Quadro VII).

Quadro VI : Escore numérico para Index de Atividade Histológica de espécimes de biópsia hepática- Index máximo = 18 – Adaptado de Knodell 1981 – Hepatology.

I-Necrose periportal +/- necrose em ponte	Escore	II-Intralobular Necrose/degeneração	Escore	III-Inflamação portal	Escore	IV- Fibrose
A. Ausente	0	A. Ausente	0	A. Ausente	0	A. Ausente
B. PMN discreta	1	B.Discreta (Apoptose, balonização, necrose focal <1/3 dos lóbulos ou nódulos)	1	B. Discreta (poucas células inflamatórias em 1/3 dos espaços portas)	1	B.Expansão portal
C. PMN moderada (< 30% da circunf. Da maioria dos espaços porta)	3	C.moderada (Compromete 1/3-2/3 dos lóbulos ou nódulos)	3	C. Moderada ( muitas células inflamatórias em 1/3-2/3 dos espaços porta)	3	Pontes de fibrose (portal-portal, portal-central)
D.PMN intensa (>50% da circunf. Da maioria dos espaços porta)	4	D. Intensa (compromete mais de 2/3 dos lóbulos ou nódulos)	4	D. Intensa (densa inflamação > 2/3 dos espaços porta)	4	D. Cirrose
E. PMN moderada + necrose em ponte	5					
F. PMN intensa + necrose em ponte	6					
G. Necrose multilobular	10					

PMN= Necrose em *piecemeal*

O sistema de escore METAVIR foi criado por um grupo cooperativo composto por 10 patologistas franceses especialistas em histologia hepática. O objetivo desses pesquisadores foi estimar as variações inter e intra-observadores na avaliação das características histológicas, classificar e criar um escore numérico na hepatite crônica pelo vírus C. O resultado foi um sistema de escore simples que demonstrou que a classificação da hepatite C crônica baseada na avaliação semi-quantitativa dissociando as lesões necroinflamatórias de fibrose oferece mais reprodutibilidade que o uso de índice numérico global (BESSODA, 1994). Esse sistema tem sido validado em grandes grupos de pacientes com hepatite crônica pelo vírus C e tem mostrado boa

reprodutibilidade intra e interobservadores(MARCELIN, 2002) (Quadros VIII e IX). No Brasil um sistema de classificação e estadiamento das hepatites crônicas foi proposto pelo Clube de Hepatopatologia da Sociedade Brasileira de Patologia à Sociedade Brasileira de Hepatologia e foi aprovado no 15º Congresso da SBH no Rio de Janeiro em Outubro de 1999. Essa classificação é centrada na etiologia do processo que inclui: Hepatites crônicas pelos vírus B, C e delta, outros vírus, auto-imunidade, drogas, doença de Wilson além das hepatites criptogênicas. Não é aplicada para outras doenças hepáticas, que também levem a alterações estruturais e eventualmente à cirrose por mecanismos diferentes como as esteato-hepatites. É padronizada de 0 a 4 tanto para estadiamento quanto para a avaliação da atividade necroinflamatória (Quadro X).

Quadro VII: HAI de Kondell modificada por Ishak em 1995

<b>ALTERAÇÃO HISTOLÓGICA</b>	<b>GRAU</b>
<b>A. Hepatite de Interface</b>	
Ausente	0
Discreta ( Focal ou poucos EP)	1
Discreta/moderada (focal/, maioria dos EP)	2
Moderada ( contínua em torno de < 50% dos EP e septo)	3
Intensa ( contínua em torno de >50% EP e septo)	4
<b>B. Necrose Confluente</b>	
Ausente	0
Focal	1
Zona 3 algumas áreas	2
Zona 3 maioria das áreas	3
Zona 3 + ocasionais pontes P-C	4
Zona 3 + múltiplas ponte P-C	5
Panancinar ou multiacinar	6
<b>C. Necrose lítica focal, apoptose e inflamação focal</b>	
Ausente	0
Um pouco ou menos 2 focos por objetiva de 20X	1
Dois a quatro focos por objetiva de 10X	2
Cinco a dez focos por objetiva de 10X	3
Mais de dez focos por objetiva de 10X	4
<b>D. Inflamação Portal</b>	
Ausente	0
Discreta	1
Moderada	2
Moderada/intensa	3
Intensa	4
<b>GRAU MÁXIMO</b>	<b>18</b>
<b>Estadiamento: Alteração estrutural, fibrose e cirrose</b>	
Sem fibrose	0
Alargamento de alguns EP c/ ou s/ septos curtos	1
Alargamento da maioria dos EP c/ou s/ septos curtos	2
Alargamento dos EP com ocasionais septos P-P	3
Alargamento dos EP c/ septos P-P e P-C	4
Septos P-P e P-C e ocasionais nódulos	5
Cirrose provável ou definida	6



Quadro VIII: **SISTEMA METAVIR 1996**

## ALGORÍTIMO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HISTOLÓGICA

PMN	+	Necrose	=	SCORE
0( ausente)		0(ausente/discreta)		0(ausente)
0		1(moderada)		1(discreta)
0		2( Intensa)		2(moderada)
1(discreta)		0,1		1
1		2		2
2(moderada)		0,1		2
2		2		3(intensa)
3(intensa)		0,1,2		3( severa)

Quadro IX: **SISTEMA METAVIR 1996**

Graduação da fibrose	
DESCRIÇÃO	GRAU
Sem fibrose	0
Alargamento estrelar dos EP, sem septo	1
Alargamento dos EP com raros septos	2
Numerosos septos sem cirrose	3
Cirrose	4

Quadro X: Sociedade Brasileira de patologia –  
Classificação das Hepatites Crônicas

<b>ALTERAÇÃO HISTOLÓGICA</b>	<b>GRAU</b>
<b><u>I. Alterações Estruturais</u></b>	
Arquitetura Normal	0
Expansão fibrosa dos EP	1
Fibrose dos EP com septos P-P	2
Fibrose dos EP c/ Septos P-P e P-C c/ esboço de nódulos	3
Cirrose	4
<b><u>II. Inflamação Portal</u></b>	
Raros Mononucleares	0
Discreto infiltrado	1
Moderado Infiltrado	2
Moderado/intenso infiltrado	3
<b><u>III. Atividade periportal/periseptal</u></b>	
Ausência de inflamação/lesão	0
Discreta infiltração sem lesão	1
PMN discreta (focal em poucos EP)	2
PMN moderada (focal em vários EP ou moderada em poucos EP).	3
PMN intensa (extensa em vários EP)	4
<b><u>IV. Atividade no parênquima</u></b>	
Normal	0
Discreta (raros focos de necrose)	1
Moderada (necrose focal múltipla)	2
Necrose confluyente focal	3
Necrose confluyente extensa	4

É importante, entretanto, enfatizar as limitações desses sistemas de escore. A fibrose hepática pode não ser homogênea na estrutura do órgão e o fragmento de fígado obtido na biópsia por agulha pode, então, não ser representativo do real estágio de fibrose. Esta representatividade aumenta, é claro, com o tamanho da amostra. O mínimo requerido em alguns estudos é de pelos menos 10 mm. Mas independente do tamanho da amostra, a fibrose ainda assim pode ser subestimada e a cirrose não detectada em alguns pacientes (MARCELIN, 2002).

## **II.6-Tratamento:**

O vírus C da hepatite tem como complicações a fibrose progressiva levando a cirrose e o carcinoma hepatocelular, estima-se que 3% da população mundial é portador do VHC (ALTER, 1992a). Este vírus que tem uma prevalência de 1 a 2% em nosso meio é considerado, hoje, uma das principais causas de doença hepática e de indicação para o transplante hepático justificando-se o tratamento dessa infecção (LYRA 2003).

### **Objetivo do tratamento:**

O objetivo do tratamento da infecção crônica pelo vírus C é a resposta virológica sustentada (RVS). HCV-RNA é realizado antes, durante, ao final do tratamento e 24 semanas depois e a RVS é definida como ausência de HCV-RNA detectável pelo método de PCR ao final do tratamento e 24 semanas após o final do tratamento. O RVS está relacionada benefícios bioquímicos, virológicos e histológicos a curto prazo com uma melhora clínica dos pacientes no que diz respeito a sintomatologia, funções e importante melhora da qualidade de vida (BONKOVSKY, 1999) . Os efeitos sobre a sobrevida dos pacientes portadores de hepatite crônica pelo vírus C não está bem determinada.

### **Esquemas terapêuticos:**

Historicamente a terapêutica para a hepatite C iniciou-se com monoterapia com interferon (INF) standard (STD), durante 6 meses, com resultados favoráveis, porém,

insuficientes (1991-1997) ( POYNARD, 1996). Usando o INF STD como monoterapia por 6 meses 3 MU 3vezes por semana a taxa de RVS foi de 22% comparada a 1% da evolução natural . No período de 1997-1998 a monoterapia com INF STD foi prolongada para 12 meses com discreta melhora dos resultados ( 38%). Os estudos mostraram que a associação de INF STD e ribavirina era mais eficaz que a monoterapia. A resposta terapêutica ao INF STD chega a 41% quando associado à ribavirina ( MCHUTCHISON, 1998) e ( POYNARD, 1998). Entre 1999-2000 foi iniciada a monoterapia com um novo INF, sob a forma de uma molécula peguilada e a partir de 2001 surgiram trabalhos com PEG INF associada a Ribavirina( MANNNS, 2001). A relação custo benefício tem sido avaliada sendo favorável ao tratamento com o PEG apesar do alto custo em relação ao INF STD, já que o primeiro mostrou-se superior nos seguintes aspectos:

- Aumento da sobrevivência do INF
- Aumento da atividade anti-viral do INF
- Reduz o *clearance* renal do interferon
- Eliminação renal mais lenta
- Comodidade de administração: Uma injeção semanal por via subcutânea o PEG INF mantém-se com níveis terapêuticos por uma semana, enquanto que o INF STD mantém o nível por 48h.
- Melhora das taxas de RVS: Nos pacientes com vírus C a RVS é observada 42 a 46% dos casos comparada a 33 a 36% com INF STD. No Brasil cerca de 70% dos

pacientes têm genótipo 1, no que se refere aos genótipos 2 e 3 não foi observado vantagem significativa na terapia combinada com PEG INF(76-82%) com a terapia combinada com INF STD (61-79%), portanto o elevado custo do PEG INF não justifica o seu emprego nos pacientes com estes genótipos, devendo ser mantido o INF STD.

### **Quem tratar:**

A decisão de tratamento é complexo. Como o tratamento tem custo alto, pode não curar muitos casos e tem alguns efeitos colaterais pacientes precisam ser selecionados. A decisão de tratamento deve ser feita após análise da biópsia hepática e os pacientes classificados como tendo doença leve moderada ou intensa às características histológicas.

Os pacientes com doença leve a recomendação é de que esses pacientes podem ser observados sem tratamento desde que avaliações regulares sejam feitas e biópsias repetidas a cada 2 a 3 anos ou se houver alterações de ALT importantes e se ocorrer piora da atividade inflamatória considerar tratamento ( BOOTH, 2001 ).

O tratamento deve ser oferecido a todos os pacientes com doença moderada ou intensa.

Nos pacientes cirróticos a RVS melhora com terapia combinada quando comparada à monoterapia e alguns estudos sugerem uma tendência a redução das taxas de evolução para carcinoma hepatocelular ( FATTOVICH, 1997a).

Nos pacientes com cirrose descompensada a probabilidade de sobrevida após a primeira descompensação é de 50% em 5 anos ( FATTOVICH, 1997b) e existem poucos dados sobre o uso de terapia anti-viral nesse pacientes.

Ainda não está definido o tratamento da hepatite aguda pelo vírus C. Os poucos estudos são com monoterapia com interferon ou com INF STD e ribavirina. Estes estudos sugerem vantagens no tratamento da hepatite aguda considerando que a negatificação sustentada do HCV-RNA foi mais elevada no grupo tratado. Independente do genótipo viral o tratamento deve ser de 1 ano ( LYRA, 2003).

### **Crítérios de inclusão para o tratamento:**

Resumindo, baseado em estudos controlados multicêntricos e reuniões de consenso incluem-se os seguintes pacientes para terapêutica anti-viral:

- ALT > 1,5 vezes o limite superior da normalidade por 6 meses;
- HCV-RNA presente no soro;
- Doença hepática compensada;
- Biópsia hepática revelando fibrose portal ou em ponte e atividade inflamatória moderada ou necrose;
- Pacientes aderentes;
- Ausência de contra-indicações para o tratamento;

### **Contra- indicações para a terapia anti-viral:**

Doença descompensada;

Doença neuro psiquiátrica importante (depressão);

Doença auto-imune;

Anemia ( variável, em geral HB< 10g%)

Hemólise;

Insuficiência renal;

Coronariopatia;

Doença vascular cerebral;

Inabilidade de praticar contracepção;

### **Fatores preditores de resposta:**

Fatores pré- tratamento têm sido analisado para avaliar melhor resposta ao

tratamento de interferon e ribavirina e os fatores relacionados a resposta mais

favorável foram (POYNARD, 1998):

Sexo feminino;

Pacientes jovens ( <40 anos);

Baixa carga viral ( < 2 milhões de cópias / ml);

Genótipos 2 e 3;

Fibrose mínima à biópsia;

Como perspectivas futuras espera-se que novos medicamentos seja incorporados ao atual esquema terapêutico, melhorando as taxa de resposta viral sustentada, como os inibidores de proteases, helicase e polimerases do vírus C, ou drogas que inibam a infecção, evitando a entrada do vírus na célula, como anticorpos neutralizantes e peptídeos.

### **Profilaxia:**

Devido à estrutura viral não existem hoje vacinas contra a hepatite pelo vírus C portanto a sua profilaxia é baseada, hoje, em medidas comportamentais, excluindo-se doadores de sangue anti-HCV positivos no soro oferecendo uma maior segurança nas transfusões. Estudos em chimpanzé estão sendo realizados na tentativa de desenvolver vacinas para esta doença.



# ARTIGO

## **Sobrecarga de ferro no tecido hepático de pacientes portadores de hepatite crônica pelo vírus C**

**TÍTULO:** Sobrecarga de ferro no tecido hepático de pacientes portadores de hepatite crônica pelo vírus C.

**AUTORES:** Souza RM<sup>1,2</sup>, Freitas LAR<sup>3</sup>, Lyra AC<sup>1,2</sup>, Moraes CF<sup>2</sup>, Braga EL<sup>1,2</sup> Lyra, LGC<sup>1,2</sup>.

***Serviço de Gastro-Hepatologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos - Universidade Federal da Bahia<sup>1</sup>; Serviço de Gastro-Hepatologia do Hospital São Rafael<sup>2</sup>; Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (FioCruz-Ba)<sup>3</sup>;***

**RESUMO :**

**Introdução:** Infecção pelo vírus C pode progredir para hepatite crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular. Os fatores de risco associados a progressão clínica mais importante são: sexo masculino, carga viral, álcool, co-infecção (HIV,HBV). Mais recentemente, o papel da sobrecarga de ferro nesta evolução e na resposta terapêutica tem sido avaliado. **Objetivos:** **1-** Determinar a presença de sobrecarga de ferro no tecido hepático em pacientes portadores de hepatite crônica pelo Vírus C em Salvador-Ba. **2-** Correlacionar os genótipos do VHC c/ a presença de sobrecarga de ferro; **3-** Correlacionar os aspectos histológicos dessas amostras com a sobrecarga de ferro. **4-** Avaliar as conseqüências da sobrecarga de ferro sobre a resposta ao tratamento com Interferon Alfa associado a Ribavirina. **Material e métodos:** Foram estudadas 95 amostras de tecido hepático de pacientes portadores de hepatite crônica pelo vírus C. Esses pacientes foram divididos em: **Grupo I**-presença de sobrecarga de ferro e **Grupo-II** ausência de sobrecarga. A avaliação histológica foi feita através do Sistema METAVIR. Esses pacientes tinham média de idade de 45,75 anos, 25,26% eram mulheres. A determinação do genótipo foi realizada em 69 pacientes com predomínio de 70,1% do genótipo 1. O tratamento com a associação de alfa-

interferon e ribavirina foi realizado em 85 dos 95 pacientes do estudo. Foram excluídos pacientes com etilismo, associação com vírus B e/ou HIV, hemotransfusão recente, hemocromatose, talassemia e hemofilia. **Resultados:** Trinta pacientes (31,58%) pertenciam ao grupo I. Houve predomínio de sobrecarga de ferro no tecido hepático de pacientes do sexo masculino (36,62% X 16,67%), mas sem significância estatística  $p=0,069$ . A sobrecarga de ferro esteve presente em 28,57% dos pacientes com genótipo 1 e em 30% dos pacientes com genótipo não 1 ( $p=0,906$ ). Não foi observada significância estatística da sobrecarga de ferro quanto ao grau de atividade inflamatória ( $p=0,47$ ), entretanto, 29,7% das amostras com sobrecarga de ferro tinham atividade de A0-A1-A2 e 46,15% atividade A3-A4. Houve predominância de sobrecarga de ferro nos pacientes com fibrose mais intensa: 41,18% em estágios F2 e F3, 38,1% em estágios F4 e 4,35% em estágios F0/F1 ( $p= 0,005$ ). A resposta ao tratamento com interferon e ribavirina não sofreu influência da sobrecarga de ferro no tecido hepático: 28,57% dos pacientes que tiveram resposta sustentada à terapêutica tinham sobrecarga de ferro comparados a 32,14% dos pacientes que não responderam à terapêutica ( $p=0,73\%$ ). **Conclusão:** A prevalência de sobrecarga de ferro nos pacientes portadores de hepatite foi de 31,58% em nosso estudo. Não houve diferença estatística em relação a sexo, idade, níveis de ALT , genótipo, atividade inflamatória e resposta à terapêutica, entretanto observamos uma maior predominância de sobrecarga de ferro nos pacientes com fibrose mais intensa.

**Palavras Chaves:** Hepatite C, sobrecarga de ferro, genótipo, atividade inflamatória, fibrose, resposta terapêutica.

**ABSTRACT:****Effect of iron overload on the severity of liver histologic alterations and response to interferon therapy of patients with hepatitis C infection**

*Souza RM<sup>1</sup>, Freitas LAR<sup>3</sup>, Lyra AC<sup>1,2</sup>, Moraes CF<sup>2</sup>, Braga EL<sup>1</sup> Lyra, LGC<sup>1,2</sup>.*

*Serviço de Gastro-Hepatologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos - Universidade Federal da Bahia<sup>1</sup>; Serviço de Gastro-Hepatologia do Hospital São Rafael<sup>2</sup>; Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (FioCruz-Ba)<sup>3</sup>;*

Hepatitis C infection may progress to chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Risk factors associated with a more severe clinical progression are male gender, alcohol ingestion and co-infection with HIV and HBV. Recently, the role of hepatic iron load has been under evaluation. **Goals:** To determine hepatic iron load in patients with chronic HCV infection and to correlate with HCV genotypes and with liver histologic alterations. To evaluate the influence of iron load in the response to interferon and ribavirin therapy. **Methods:** We evaluated liver samples of 95 patients with chronic hepatitis C infection. Patients were divided into 2 groups: **GI** - presence of iron overload in hepatic tissue. **GII** - absence of iron overload. Liver histologic alterations were graded using METAVIR system. We excluded patients with a history of alcohol abuse, blood transfusion in the previous 90 days, hemochromatosis, talassemia, hemophilia and co-infection with HBV/HIV. **Results:** Patients mean age was 46 years (27-62). There were 71 males (74,7%). Sixty-nine out of 95 individuals were subjected to HCV genotyping. HCV genotype 1 infection was detected in 70,1% of cases. Eighty-five patients were treated with combination of interferon 2 $\alpha$  and ribavirin. Thirty patients comprised G-I, and 65, G-II. Iron overload was detected in 36,6% of males and 16,7% of females (p=0,069) and 14 patients (28,6%) infected with HCV genotype 1 as compared to 6 (30%) infected with non-1 genotype (p=0,906). Iron overload was more frequently encountered in liver tissue of patients with a more severe stage of fibrosis: 4,35% of individuals with METAVIR score F0/F1,

41,2% of those with stage F2/F3 and 38,1% of patients with stage F4 ( $p= 0,005$ ). Twenty-eight out of 85 treated patients (32,9%) had SVR and 8 (28,57%) of them had hepatic iron load. Among the 57 non-responders, liver iron accumulation was detected 31,7% ( $p=0,73$ ). **Conclusions:** Hepatic iron overload was observed in 31,6% of patients with hepatitis C, especially males. There was no association between HCV genotype and response to interferon and ribavirin therapy with iron overload. A greater iron accumulation was associated with a more severe stage of liver fibrosis. These results indicate the need for larger multicenter studies to evaluate the role of iron load and clinical outcome in patients with chronic hepatitis C.

**Key Words:** Hepatitis C infection, Iron Overload, Genotype, inflammatory activity, fibrosis, response to antiviral therapy.

## **JUSTIFICATIVA:**

A infecção pelo vírus C tem uma prevalência alta. Cerca de 85% dos indivíduos com hepatite aguda por esse vírus (HCV) progride para a forma crônica. Em um período de 30 anos, aproximadamente 20% dos indivíduos infectados desenvolvem fibrose e cirrose e desses cerca de 20% evoluirá para CHC. Alguns fatores, influenciam a evolução desses pacientes, dentre eles estão: carga viral, genótipo, álcool, co-infecção (HIV, VHB) (LEONARD, 1999). Mais recentemente, a presença de sobrecarga de ferro tem sido alvo de investigações visto que alguns autores têm demonstrado sua interferência sobre a evolução com influência no desenvolvimento de fibrose e possivelmente de carcinoma hepatocelular e sobre a resposta à terapia com interferon e ribavirina, entretanto ainda é controversa na literatura esta influência o que justifica a realização de mais estudos para um maior conhecimento sobre este assunto.

## **OBJETIVOS :**

### PRINCIPAL:

1. Determinar a prevalência de sobrecarga de ferro no tecido hepático de pacientes portadores de hepatite crônica pelo vírus C.

### SECUNDÁRIOS:

2. Correlacionar, nestes pacientes, aspectos da histologia hepática com a presença de sobrecarga de ferro.
3. Correlacionar, nestes pacientes, as características genótípicas do vírus da hepatite C com a presença de sobrecarga de ferro.
4. Avaliar nos pacientes tratados com Inteferon Alfa e Ribavirina se a resposta ao tratamento foi influenciada pela presença de sobrecarga de ferro no tecido hepático.

## **Materiais e Métodos**

Trata-se de um estudo descritivo de prevalência onde foram analisadas 95 amostras de biópsia hepática obtidas de 95 pacientes, no período de 1995 a 2001. Do total de 110 amostras foram incluídas 95 que apresentavam tecido hepático suficiente para análise. As amostras foram originárias de três centros de referência para pacientes com doenças hepáticas da cidade de Salvador - Ba - Instituto de Fígado e Gastroenterologia, entidade de caráter privado, serviço de Gastro-Hepatologia do Hospital São Rafael entidade de caráter privado e público e o

?

Serviço de Gastro-Hepatologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos que é unicamente público.

### *Crítérios de inclusão*

#### *Pacientes:*

As amostras provinham de pacientes com hepatite crônica pelo vírus C, de ambos os sexos, com idade entre 27 e 62 anos que apresentavam aminotransferases em níveis  $\geq 1,5$  vezes o limite superior da normalidade, submetidos à biópsia hepática para definição terapêutica. Todos os pacientes tinham positividade no soro para o anti-HCV ( determinado pelos métodos de ELISA II ou ELISA III) e para o HCV-RNA pelo PCR-RT.

Dos 95 pacientes estudados, 85 foram submetidos à terapia com Interferon em dois esquemas: Um esquema correspondia ao uso de dose indução de 3 MU de alfa interferon diariamente nos 3 primeiros meses seguido de interferon 3 vezes por semana até completar um ano. Outro esquema empregava 3MU de alfa interferon 3 vezes por semana . Nos dois esquemas foi associada a ribavirina por via oral na dose de 1g/dia.

#### *A histologia:*

As amostras foram fixadas em formalina e embebidas em parafina. Secções de 3-5mm de espessura foram coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina e picrosirius e impregnadas pela prata para reticulina segundo o método de Gomori. A coloração de Perls prussian blue foi utilizada para determinação de sobrecarga de



ferro. A atividade necro-inflamatória e o estadiamento de fibrose foram analisados segundo os critérios da Sociedade Brasileira de Patologia e o Sistema METAVIR. A semi - quantificação de ferro no tecido hepático foi feita pelo método de Searle em escala crescente de zero a quatro.

*Os grupos:*

Os pacientes foram agrupados segundo as características da biópsia hepática:

**Grupo I:** aqueles que apresentavam sobrecarga de ferro no tecido.

**Grupo II:** aqueles que não expressavam sobrecarga de ferro à coloração de "Perls".

*Os prontuários:*

Os prontuários médicos dos pacientes dos quais as amostras foram obtidas foram analisados de forma retrospectiva quanto a sexo, idade, níveis de aminotransferases, genótipo e resposta terapêutica ao tratamento combinado de interferon associado a ribavirina. Foi considerado resposta terapêutica, a permanência do HCV-RNA negativo no soro, 6 meses após o término do tratamento.

Essas variáveis foram comparadas nos dois grupos.

*Crerios de exclusão:*

Foram excluídos do estudo:

- 1- Pacientes submetidos a hemotransfusão nos últimos 30 dias;
- 2- Pacientes com outras condições que levem a sobrecarga de ferro como:

- a) Alcoolismo, considerado como ingestão diária de 60 g de etanol para homens e 40 g para mulheres ou evidência à histologia de hepatopatia alcóolica,
- b) Diagnóstico prévio, saturação de transferrina > 55% ou evidência histológica de hemocromatose;
- c) Hemofilia ou talassemia;
- d) Co-infecção com o vírus B (VHB) da hepatite ou com o vírus da imunodeficiência humana ( HIV).

#### *Análise estatística.*

Na análise estatística foram calculadas estatísticas descritivas univariadas e bivariadas. Foram empregados testes não paramétricos na comparação entre grupos, escolhidos em função do nível de mensuração, número de grupos e relação de dependência entre eles: Qui- quadrado de Pearson não corrigido e prova de Mann-Whitney. Foi também calculada a medida de associação epidemiológica, razão de prevalências.

#### *Comissão de ética.*

O trabalho foi aprovado e autorizado pela comissão de ética em pesquisa do Hospital São Rafael.

## Resultados

Dos 95 pacientes estudados 30 tinham sobrecarga de ferro no tecido hepático (31,58%), mais freqüentemente encontrada de forma simultânea nos hepatócitos e células de Kupffer (52%) do que isoladamente (38% apenas nos hepatócitos e 10% nas células de Kupffer). Vinte e quatro dos 95 pacientes eram do sexo feminino (25,26%) e 71 do sexo masculino (74,74%). A média de idade foi de 45,75 anos (DP= 8,68) com o mínimo de 27 anos e o máximo de 62 anos. Em 69 indivíduos houve determinação do genótipo havendo uma predominância do genótipo 1 em 20 (70,01%) e de genótipo não 1 em 49 ( 28,99%). /1

Entre os 85 pacientes tratados com terapia combinada, 29 (34,11%) obtiveram sucesso terapêutico (resposta terapêutica sustentada) e 56 (65,88%) foram insucesso terapêutico(Tabela 1).

A análise histológica revelou que 53 (55,78%) dos 95 pacientes apresentavam esteatose hepática: grau leve em 36,84% dos casos, moderado em 9,47% e intenso em 9,47% ( Tabela 1). Segundo o sistema METAVIR a fibrose F0/F1 estava presente em 23 (24,21%) , F2/F3 em 51 ( 53,678%) e F4 21 (22,11%) dos casos (Tabela 1). A atividade inflamatória A0/A1 foi verificada em 41 (43,16%), A2 em 41 (43,16%) e A3/A4 em13 (13,68%) dos pacientes (Tabela 1).

Segundo os grupos estudados, Grupo I (com sobrecarga de ferro no tecido hepático ), Grupo II ( sem sobrecarga de ferro), as variáveis foram analisadas comparativamente (tabela 5). Não houve diferença estatística em relação à idade

(45,43 anos para os pacientes do Grupo I [DP-8,31] X 45,89 anos para os pacientes do Grupo II [DP-8,91]) , em relação ao sexo ( $p= 0,069$ ) embora houvesse uma predominância de sobrecarga de ferro nos indivíduos do sexo masculino (36,62% para o sexo masculino e 16,67% para o sexo feminino). Os níveis de ALT não variaram de maneira significativa nos dois grupos ( $P=0,2$ ). Nos pacientes relacionados no Grupo I, 14 tinham genótipo 1 ( 28,57%) e seis, genótipo não 1( 30%). Nos indivíduos do Grupo II, 35 (71,43%) eram genótipo 1 e 14 (70%) genótipo não 1. Não houve diferença estatística entre os grupos estudados(  $p=0,9$ ), (Tabela 2).

Quando avaliamos resposta terapêutica dos pacientes tratados com a terapia combinada e a comparamos com presença ou não de sobrecarga de ferro observamos que também não houve diferença estatística entre os dois grupos: 8 (28,57%) dos pacientes que tiveram resposta sustentada à terapêutica tinham sobrecarga de ferro comparados a 18 (32,14%) dos pacientes que não responderam à terapêutica ( $p=0,73$ ) ( Gráfico 2 ). ? Gráfico 3

A análise dos dados histológicos revelou tendência à sobrecarga de ferro no estágio F2 do sistema METAVIR ( $p=0,005$ ) (Tabela 3), entretanto, não foi verificado influência da sobrecarga de ferro segundo a atividade inflamatória (  $P=0,47\%$ ) (Tabela 4). Presença de esteatose hepática não foi diferente nos grupos estudados (  $p=0,31$ ) (Gráfico 1).

Tabela 01- Descrição de cada variável de forma isolada no estudo ✓

Variáveis	Prevalência	
	(n)	(%)
Ferro	(95)	31,58
Idade	(95)	45,75* (8,68)
<u>Sexo</u>		
F	(24)	25,26
M	(71)	74,74
<u>Serviços</u>		
HSR	(32)	33,66
IFG	(39)	41,05
HUPES	(24)	25,26
<u>Genótipo</u>		
1	(20)	70,01
ñ-1	(49)	28,98
Resposta terapêutica	(85)	34,11
<u>Esteatose</u>		
Ausente	(42)	44,21
Leve	(35)	36,84
Moderada	(9)	9,47
Intensa	(9)	9,47
<u>Fibrose</u>		
F0-F1	(23)	24,21
F2-F3	(51)	53,68
F4	(51)	22,11
<u>Atividade</u>		
A0-A1	(41)	43,16
A2	(41)	43,16
A3-A4	(13)	13,68
<b>* Média e DP</b>		

Tabela 2- Descrição da relação sobrecarga de ferro e genótipo ✓

Genótipo	Grupo I	Grupo II	Total
1	14(70%)	35(71,43%)	49(71,01%)
Não1	6(30%)	28(57%)	20(28,99%)
total	20(100%)	49(100%)	69(100%)

Grupo I: com sobrecarga de ferro. Grupo II: sem Sobrecarga de ferro

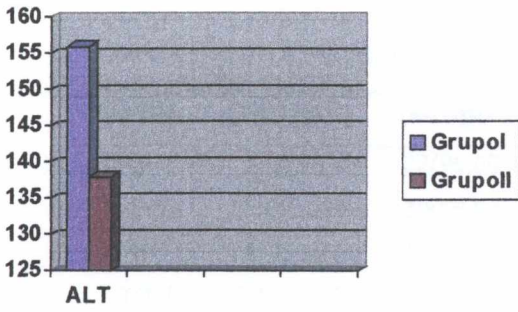
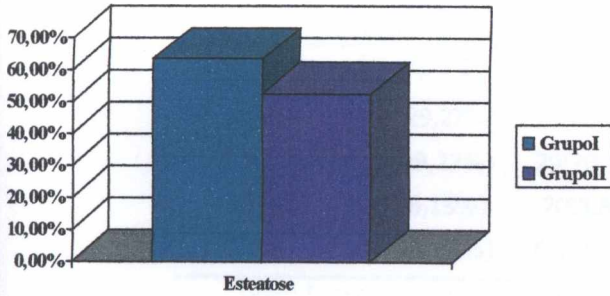


Gráfico1- Relação entre sobrecarga de ferro e níveis de ALT  
GrupoI; Com sobrecarga de ferro  
GrupoII: Sem sobrecarga de ferro



*Di Ferrarol*

Gráfico 2- relação entre presença de esteatose hepática E sobrecarga de ferro  
GrupoI: com sobrecarga de ferro  
Grupo II: sem sobrecarga de ferro

Tabela 3 - Relação sobrecarga de ferro e fibrose hepática

<b>Fibrose</b>	<b>(Grupo I)</b>	<b>(Grupo II)</b>
F0-F1	1 (4,35%)	22(95,65%)
F2-F3	21(41,18%)	30(58,82%)
F4	8(38,10%)	13(61,90%)
Total	30(31,58%)	65(68,42%)

Grupo I: com sobrecarga de ferro.

Grupo II: sem Sobrecarga de ferro

P= 0,005

Tabela 4- Relação sobrecarga de ferro e atividade inflamatória

<b>Atividade</b>	<b>(Grupo I)</b>	<b>(Grupo II)</b>
A0-A1	12 (29,27%)	29(70,73%)
A2	12(29,27%)	29(70,73%)
A3-A4	6(46,15%)	7(53,85%)
Total	30(31,58%)	65(68,42%)

Grupo I: com sobrecarga de ferro.

Grupo II: sem Sobrecarga de ferro

P=0,47%

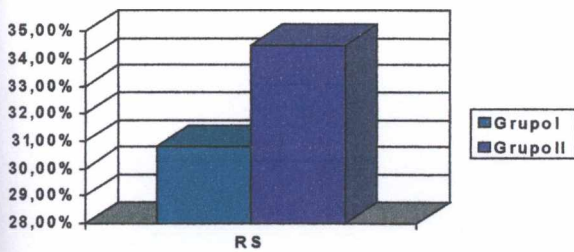


Gráfico 3; relação entre resposta terapêutica e sobrecarga de ferro

RS= Resposta Sustentada

Grupo I: com sobrecarga de ferro

Grupo II: Sem sobrecarga de ferro

Tabela 5- Análise bivariada entre sobrecarga de ferro e variáveis do estudo

Variável	Sobrecarga de Fe <sup>++</sup> (%)	Valor de P
Sexo	F-16,67 M-36,62	0,069
Idade	45,43	
Genótipo	1-28,57 ñ1-30,00	0,906
Resposta terapêutica	S-28,57 I-32,14	0,739
Esteatose	<b>S/ est</b> -26,19 <b>Leve</b> -28,57 <b>Moderada</b> -55,56 <b>Intensa</b> -44,44	0,284
Fibrose	<b>F0-F1</b> -4,35 <b>F2-F3</b> -41,18 <b>F4</b> -38,10	0,005
Atividade	<b>A0-A1</b> -29,27 <b>A2</b> -29,27 <b>A3-A4</b> -46,15	0,477



## DISCUSSÃO:

A hepatite pelo vírus C é, hoje, considerada uma endemia, com prevalência alta em alguns países. Sua associação com cirrose hepática e carcinoma hepatocelular está comprovada e a descoberta de mecanismos que interrompam esta evolução tornou-se um desafio para os hepatologistas. O presente estudo aborda aspectos controversos quanto ao papel da presença de ferro no tecido hepático, em pacientes com infecção crônica pelo vírus C.

A associação entre ferro e hepatite viral foi questionada inicialmente em pacientes com hepatite aguda pelo vírus B <sup>1</sup>. Logo após a clonagem do vírus C foi descrita a relação entre a infecção viral e níveis séricos de ferro e ferritina. Posteriormente outros autores passaram a relacionar os níveis de ferro no tecido hepático com a intensidade da infecção viral ou com a resposta ao tratamento com anti-virais<sup>2,3</sup>. Desde então, outros trabalhos surgiram investigando o real papel do ferro na evolução da hepatite crônica pelo vírus C. Os resultados são contraditórios. Este é um estudo de caráter descritivo onde foram analisadas 95 amostras de biópsia hepática. Presença de sobrecarga de ferro no tecido hepático foi observada em 31,58% das amostras analisadas. Outros autores descreveram variáveis freqüências de sobrecarga de ferro na hepatite crônica C: desde 73% em 63 pacientes tratados com Interferon descrito por Ikura e cols. em 1996 <sup>4</sup>, à 10% relatado por Riggio e cols. em 1997 <sup>5</sup>. Nossos resultados se aproximam dos encontrados por Kazemi-Shirazi e cols., em 1999,

quando avaliaram em pacientes com hepatite crônica C, a relação entre presença de ferro e mutações do gen da hemocromatose. Verificaram sobrecarga de ferro em 33,3% dos pacientes estudados<sup>6</sup>. Em 1999, Hezode relata freqüência de sobrecarga em 42,1% dos indivíduos com hepatite crônica C<sup>7</sup>.

A concentração de ferro seria a maneira mais precisa de determinar o ferro no tecido hepático, entretanto, a quantificação do ferro no tecido é uma técnica pouco disponível na maioria dos grandes centros de pesquisa. Para sua determinação necessita-se de técnicas histomorfométricas computadorizadas ou espectrometria atômica. Em nosso meio a avaliação do ferro tecidual foi exequível através de métodos bioquímicos. Kazwmi-Shirazi e cols<sup>6</sup>, Daugnier Y e cols<sup>8</sup> e Ikura e cols<sup>4</sup>, observaram boa correlação dos métodos bioquímicos com as determinações semi – quantitativas em tecido hepático.

As 95 amostras de biópsia foram distribuídas em 2 grupos: **GI-** com sobrecarga de ferro presente e **GII-** com sobrecarga ausente. Na análise multivariada notamos que em relação às características clínicas não houve diferença estatística quanto a idade e sexo, embora houvesse predominância de sobrecarga de ferro em pacientes do sexo masculino( Tabela 5). Ikura e cols<sup>4</sup> também não observaram diferença estatística entre os sexos. Tung e cols<sup>9</sup> descreveram predomínio de ferro no tecido hepático em homens apenas em doença compensada, não havendo diferença nos pacientes em estágio final de doença. Hezode e cols<sup>7</sup>, mostraram predominância, estatisticamente significativa, em indivíduos do sexo masculino. Alguns autores

sugerem menor sobrecarga de ferro em mulheres como consequência da depleção natural de ferro causada pelas perdas menstruais.

Os níveis de ALT não variaram nos dois grupos (média de 156,03 X 138,94 respectivamente nos pacientes com sobrecarga e sem sobrecarga) de nossa amostra. (Gráfico 1), Kazemi-Shirazi, em 1999<sup>6</sup>, encontraram resultados semelhantes quando estudaram o *status* de ferro e da mutação da hemocromatose em 114 pacientes com hepatite crônica pelo vírus C. Ikura e cols<sup>4</sup> e Beinker e cols<sup>10</sup>, em 1996, não verificaram diferença significativa dos níveis de ALT quando estudavam a influência da sobrecarga de ferro na resposta ao tratamento com interferon. DiBisceglie<sup>2</sup> observa diferença apenas nos níveis séricos de AST em relação aos níveis de ferritina mas também não observa diferença quanto os níveis de ALT e concentração de ferro hepático.

O genótipo foi determinado em 69 dos 95 pacientes. Pôr tratar-se de um estudo ambispectivo alguns prontuários não tinham referências sobre o genótipo do vírus. Dos 69 pacientes com determinação do genótipo, 70% correspondia ao genótipo 1 e 30% ao genótipo 2 e 3 (Tabela 2). A maior frequência do genótipo 1 já foi descrita na maioria dos estados do Brasil<sup>22</sup>. Na análise multivariada não se observou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com sobrecarga de ferro no tecido e o genótipo, em contraposição à relatos na literatura que descrevem maior frequência de sobrecarga de ferro em pacientes com genótipo 1. Embora vários ensaios terapêuticos mostrem resposta menos favorável ao tratamento, nos indivíduos com

genótipo 1, estudos de coorte não evidenciaram que pacientes com genótipo 1 tenham evolução natural da doença mais grave e mais desenvolvimento de cirrose hepática<sup>21</sup>.

A literatura não estabelece com clareza se a presença de sobrecarga de ferro interfere na resposta aos esquemas terapêuticos com interferon associado a ribavirina. Observações iniciais eram favoráveis à sobrecarga de ferro como um fator que contribuía para menor resposta ao tratamento. Investigações posteriores não verificaram a correlação. Atualmente não há definição quanto ao papel da sobrecarga de ferro na resposta ao tratamento da hepatite crônica C e se haveria um grupo de pacientes em que a sobrecarga poderia interferir na terapêutica.

No nosso estudo 85 pacientes correspondiam a indivíduos selecionados para um ensaio clínico sobre tratamento da hepatite crônica C com interferon associado a ribavirina, durante o período de 1 ano. Para aquele estudo os pacientes foram randomizados em dois esquemas: um grupo com dose indução de interferon diário nos 3 primeiros meses seguido de interferon 3xsemana até completar 1 ano e outro grupo com interferon 3xsemana durante todo o tratamento. A ribavirina foi administrada igualmente nos dois grupos na dose de 1g ao dia. A resposta sustentada foi de 34,11%. Não foi demonstrada associação da sobrecarga de ferro com a resposta à terapêutica na amostra estudada (Tabela 5). Na literatura permanece a controvérsia. Olynyk e cols, 1995<sup>11</sup>, Van Thiel e cols, 1994<sup>12</sup>, mostraram tendência à uma pobre resposta ao interferon- $\alpha$  quando os pacientes apresentavam sobrecarga de

ferro. Ykura e cols, 1996<sup>4</sup>, sugeriram associação da menor resposta com alterações histológicas caracterizadas por presença de depósitos de ferro em espaço porta. Riggio e cols<sup>5</sup> assim como Hofer<sup>22</sup> e cols não encontraram correlação entre respondedores e não-respondedores quanto a sobrecarga de ferro no tecido hepático. Este trabalho é criticável pelo pequeno número,14, de pacientes incluídos. Boucher e cols<sup>13</sup> não observaram associação entre concentração de ferro e respondedores ou não respondedores ao tratamento com interferon, entretanto, verificaram que a concentração de ferro hepática diminui com o tratamento independentemente da terapêutica. Alguns autores, pôr outro lado, sugerem melhor resposta à terapia combinada de Interferon- $\alpha$  e Ribavirina, quando os pacientes com sobrecarga são submetidos a depleção de ferro através de flebotomias. Alguns autores mostram que a redução dos níveis de ferro hepático diminui apenas os níveis séricos das aminotransferases, sem entretanto, alterar os títulos do HCV-RNA<sup>14,15,16</sup>, enquanto outros observaram redução da atividade inflamatória e da fibrose hepática<sup>17</sup>.

Na literatura ainda não está esclarecido se a sobrecarga de ferro é um fator de interferência na resposta ao tratamento da hepatite crônica C. A análise de nossos resultados, na amostra dos 85 pacientes, não sugeriu influência da sobrecarga de ferro na resposta terapêutica.

Ao avaliarmos a relação entre a sobrecarga de ferro no tecido hepático e as alterações histológicas encontradas notamos que não houve, em nossa amostra, associação da presença de ferro com atividade necroinflamatória. Outros autores<sup>7</sup>

descreveram associação de sobrecarga de ferro hepático com gravidade da atividade inflamatória, com acúmulo de ferro em macrófagos ou havendo uma distribuição mista em hepatócitos e macrófagos simultaneamente. Beinker e cols.<sup>10</sup>, em 31 pacientes com hepatite C, encontraram atividade inflamatória mais intensa nos indivíduos com sobrecarga de ferro. Já Ikura e cols.<sup>4</sup> verificaram associação de atividade inflamatória apenas naqueles pacientes cujo depósito de ferro ocorreu em espaço porta ou zona periportal o que teoricamente poderia interferir na resposta ao Interferon. Pôr outro lado, está bem estabelecido que o ferro contribui para a fibrogênese hepática causada. A fibrose hepática é uma resposta do fígado a insultos crônicos como infecções virais, abuso de álcool, sobrecarga de metal levando a dano hepatocelular com intenso depósito de componentes da matriz extracelular<sup>18</sup>. A fibrose é um processo dinâmico partindo do dano hepático crônico até a cirrose e é caracterizada pôr um excessivo acúmulo de componentes da matriz extracelular no fígado causada pôr uma intensa produção e um desequilíbrio na degradação<sup>19</sup>. O ferro funciona como um excelente catalisador na reação metabólica que leva à formação de radicais livres tendo um papel decisivo na formação desses derivados das formas reduzidas de O<sub>2</sub>, importante agressores celular<sup>20</sup>. Estas características podem contribuir para o desenvolvimento da cirrose hepática e do carcinoma hepatocelular. O presente trabalho corrobora os achados de literatura a cerca da influência da sobrecarga de ferro no desenvolvimento de fibrose.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS :**

Os estudos descritos na literatura não definiram o papel da sobrecarga de ferro na gravidade da infecção crônica pelo vírus C da hepatite e deixam dúvidas quanto a sua influência na resposta ao tratamento com interferon associado a ribavirina. Em nosso trabalho, a sobrecarga de ferro não interferiu nestas variáveis. A hepatite crônica C é frequentemente uma doença assintomática de evolução lenta e prolongada na ausência de co-fatores de gravidade, como a co-infecção pelo HBV ou HIV e associação com alcoolismo. Não se tem conhecimento do emprego de métodos não invasivos para análise da sobrecarga de ferro nas fases iniciais da infecção viral. A Ressonância Nuclear Magnética oferece promissora perspectiva para avaliação de ferro no tecido hepático e poderá ser utilizada em estudos prospectivos para determinar a possível influência do ferro na evolução da hepatite crônica C.

## **CONCLUSÕES :**

O Presente trabalho traz após a análise dos dados as seguintes conclusões:

1. A frequência de sobrecarga de ferro no tecido hepático dos 95 pacientes portadores de hepatite crônica foi de 31,58%;
2. Não observamos correlação estatisticamente significativa entre idade, sexo, níveis de ALT e sobrecarga de ferro, entretanto, houve uma predominância de sobrecarga de ferro em indivíduos do sexo masculino;
3. O genótipo1 predominou em nossa amostra ( 70% dos casos) mas não houve correlação entre genótipo e sobrecarga de ferro;
4. Não houve relação entre sobrecarga de ferro e resposta terapêutica em 85 pacientes submetidos a dois esquemas terapêuticos com interferon associado a ribavirina;
5. Não foi observada associação entre sobrecarga de ferro e atividade inflamatória;
6. A sobrecarga de ferro foi significativamente relacionada a um maior grau de fibrose hepática.
7. Nossos resultados sugerem a realização, em nosso meio, de estudos prospectivos para melhor avaliar o papel do ferro no tecido hepático em pacientes com hepatite crônica pelo vírus C.



## REFERÊNCIAS :

- 1- Blumberg B, Lustbader E, Whitford P. Changes in serum iron levels due to infection with hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA*; 78:3222-24, 1981.
- 2- Di Bisceglie A, Axiotis C, Hoofnagle J, Bacon B. Measurements of Iron Status in Patients with Chronic Hepatitis. *Gastroenterology*;102:2108-13, 1992.
- 3- Arber N, Konikoff F, Moshkowitz M. Increased serum iron and iron saturation without liver iron accumulation distinguish chronic hepatitis C from other chronic liver diseases. *Digestive Disease Science*;39: 2656-59, 1994.
- 4- Ikura Y, Morimoto H, Johmura H, Fukui M, Sakurai M. Relationship between hepatic iron deposits and response to Interferon in Chronic Hepatitis C. *The American Journal of Gastroenterology*; 91:1367-73, 1996.
- 5- Riggio O, Montagnese F, Fiore P, Folino S, Giambartolomei S, Gandin C, Merli M, Quinti I, Violante N, Caroli S, Senofonte O, Capocaccia L. Iron Overload in patients with Chronic Viral Hepatitis: How Common is it? *The American Journal of Gastroenterology*;92:1298-01, 1997.
- 6- Kazemi-Shirazi L, Datz C, Maier-Dobersberger T, Kaserer K, Hackl F, Polli C, Steindl P, Penner E, Ferenci P. The Relation of Iron Status and Hemochromatosis Gene Mutations in Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*, 116: 127-34, 1999.

- 7- Hezode C, Cazeneuve C, Coué O, Roudot-Thoraval F, Lonjon I, Bastie A, Duvoux C, Pawlotsky JM, Zafrani E-S, Amselem S, Dhumeaux D. Liver accumulation in patients with chronic active hepatitis C: prevalence and role of hemochromatosis gene mutations and relationship with hepatic histology lesions. *Journal of Hepatology*;31: 979-84, 1999.
- 8- Deugnier Y, Turlin B, Lóreal O. Iron and Neoplasia. *Journal of Hepatology*;28:21-5, 1998.
- 9- Tung B, Emond M, Bronner P, Raaka S, Cotler S, Kowdley K. Hepatitis C, iron status, and disease severity: Relationship with HFE mutation. *Gastroenterology*;124:318-26, 2003.
- 10- Beinker N, Voigt D, Arendse M, Smit J, Stander I, Kirsch R. Threshold effect of liver iron content on hepatitis inflammation and fibrosis in hepatitis B and C. *Journal of Hepatology*;25: 633-8, 1996.
- 11- Olynyk J, Reddy K, Di Bisceglie A, Jeffers L, Parker T, Radick J, Schiff E, Bacon B. Hepatic Iron concentration as a predictor of response to interferon alfa therapy in chronic HCV. *Gastroenterology*;108:1104- 09, 1995.
- 12- Van Thiel D, Friedlander L, Fagioli S, Wright H, Irish W, Gavler J. Response to interferon alpha therapy is influenced by the iron content of the liver. *Journal of Hepatology*;20: 410-5, 1994.

13- Boucher E, Bourienne A, Adams P, Turlin B, Brissot P, Deugnier Y. Liver iron concentration and distribution in chronic hepatitis C before and after interferon treatment. *Gut*; 41: 115-120, 1997.

14- Hyaashi H, Takikawa T, Nishimura N, Yano M. Improvement of serum aminotransferase levels after phlebotomy in patients with chronic active hepatitis C and excess hepatic iron. *The American Journal of Gastroenterology*, 89: 986-8, 1994.

15- Bacon B, Rebholz A, Fried M. Beneficial effect of iron reduction therapy in patients with chronic hepatitis C who failed to respond to interferon- $\alpha$ . *Hepatology*; 18: 150 A, 1993 - Abstract.

16- Sartori M, Adorno S, Rigamonti C, Boldorini R. Chronic hepatitis C treated with phlebotomy alone: Biological and Histological outcome. *Digestive and Liver Disease*;33:157-162, 2001.

17- Yano M, Hayashi H, Wakusawa S, Sanae F, Takikawa T, Shiono Y, Arao M, Ukai K, Ito H, Watanabe K, Yoshioka K. Long term effects of phlebotomy on biochemical and histological parameters of chronic hepatitis C. *The American Journal of Gastroenterology*;97:133-7, 2002.

18- Pietrangelo A. Metals, oxidative stress, and hepatic fibrogenesis. *Seminars of Liver Disease*;16:13-30, 1996.

19- Pietrangelo A. Iron, oxidative stress and liver fibrogenesis. *Journal of Hepatology*;28:8-13, 1998.

- 20- Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine, 2<sup>nd</sup> ed. Oxford. *Oxford University Press*, 1989.
- 21- Zeuzem S, Franke A, Lee J, Heermann G, Ruster B, Roth W. Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates and their correlation to viremia, liver function tests and Histology. *Hepatology*;1003-09, 1996.
22. Hofer H, Osterreicher C, Jessner W, Penz M, Steindl-Munda P, Wrba F, Ferenci P. Hepatic iron concentration does not predict response to standart and pegylated INF/ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *Journal of hepatology*, 40(6): 1018-22, 2004.
23. Busek S, Oliveira G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. *Genetics and Molecular Research*; 2(1):117-123, 2003.

## SUMMARY

To evaluate the influence of iron overload on the clinical and histopathological progression of patients with chronic hepatitis C (CHC), 95 individuals with CHC and iron overload were included in a retrospective study. The patients were divided into two groups: 49 patients with iron overload and 46 patients without iron overload. The mean age was 51 years (range 21-95 years). The mean age of iron overload patients was 49 years (range 21-95 years), and the mean age of non-iron overload patients was 53 years (range 21-95 years). All patients were treated with interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) and ribavirin. The patients comprised G-1, and 55 (57.9%) had no iron overload, 39 (41.4%) had mild iron overload, 15 (15.7%) females ( $p=0.069$ ), in 14 patients (28.2%) infected with HCV genotype 1 as compared to 6 (30%) infected with non-1 genotype ( $p=0.915$ ). Iron overload was more frequently encountered in liver tissue of patients with a more severe

## SUMMARY

---

### **Effect of iron load on the severity of liver histologic alterations and response to interferon therapy of patients with hepatitis C infection**

*Souza RM<sup>1,2</sup>, Freitas LAR<sup>3</sup>, Lyra AC<sup>1,2</sup>, Moraes CF<sup>2</sup>, Braga EL<sup>1</sup> Lyra, LGC<sup>1,2</sup>.*

*Universidade Federal da Bahia – Hospital Universitário Professor Edgard Santos<sup>1</sup>  
Serviço de Gastro-Hepatologia do Hospital São Rafael<sup>2</sup>; Centro de Pesquisa Gonçalo  
Muniz (FioCruz-Ba)<sup>3</sup>;*

Hepatitis C infection may progress to chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Risk factors associated with a more severe clinical progression are male gender, alcohol ingestion and co-infection with HIV and HBV. Recently, the role of hepatic iron load has been under evaluation. **Goals:** To determine hepatic iron load in patients with chronic HCV infection and to correlate with HCV genotypes and with liver histologic alterations. To evaluate the influence of iron load in the response to interferon and ribavirin therapy. **Methods:** We evaluated histologic liver samples of 95 patients with chronic hepatitis C infection. Patients were divided into 2 groups: **GI** - presence of iron load at hepatic tissue. **GII** - absence of iron load. Liver histologic alterations were analyzed using METAVIR system. We excluded patients with a history of alcohol abuse, blood transfusion in the previous 90 days, hemochromatosis, talassemia, hemophilia and co-infection with HBV/HIV. **Results:** Patients mean age was 46 years (27-62). There were 71 males (74,7%). Sixty-nine out of 95 individuals were subjected to HCV genotyping. HCV genotype 1 infection was detected in 70,1% of cases. Eighty-five patients were treated with combination of interferon 2 $\alpha$  and ribavirin. Thirty patients comprised G-I, and 65, G-II. Iron load was detected in 36,6% of males and 16,7% of females ( $p=0,069$ ), in 14 patients (28,6%) infected with HCV genotype 1 as compared to 6 (30%) infected with non-1 genotype ( $p=0,906$ ). Iron load was more frequently encountered in liver tissue of patients with a more severe

stage of fibrosis: 4,35% of individuals with METAVIR score F0/F1, 41,2% of those with stage F2/F3 and 38,1% of patients with stage F4 ( $p= 0,005$ ). Twenty-eight out of 85 treated patients (32,9%) had SVR and 8 (28,57%) of them had hepatic iron load. Among the 57 non-responders, tissue iron accumulation was detected 31,7% ( $p=0,73$ ). **Conclusions:** Hepatic iron load was observed in 31,6% of patients with hepatitis C, especially males. There was no association between HCV genotype and iron load. A greater iron accumulation was associated with a more severe stage of liver fibrosis. These results indicate the need for larger multicenter studies to evaluate the role of iron load and clinical outcome in patients with chronic hepatitis C.



# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. Abdulkarim A, Zein S, Germer J, Kolbert C, Kabbani L, Krajnik K, Hola A, Agha M, Tourogman M, Persing D. Hepatitis C virus genotypes and hepatitis G virus in hemodialysis patients from Syria: identification of two novel hepatitis C virus subtypes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 59: 571-6,1998.
2. Agnello V, Chung R, Kaplan L. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *The New England Journal of Medicine*; 327:1490-95,1992.
3. Alberti A., Morsica G, Chemello L, Cavalletto D, Noventa F, Pontisso P, Ruol A. Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *The Lancet*; 340:697-8, 1992.
4. Alter M, Margolis H, Krawczynski K, Judson F, Mares A, Alexander J, Hu P, Miller J, Gerber M, Sampliner R, Meeks E, Beach M. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *The New England Journal of Medicine*; 327:1899-1905, 1992a.
5. Alter M, Kruszon-Moran D, Nainan O, McQuillann G, Gao F, Moyer L, Kaslow R, Margolis H. The prevalence of hepatitis C virus infection the United States, 1988 through 1994. *The New England Journal of Medicine*; 341:556-62, 1999.
6. Alter M and Seef L. Recovery, persistence and sequelae in hepatitis C infection: a perspective on long-term outcome. *Seminars of Disease*; 20: 17-35, 2000.
7. Alter M. New kits on the block: evaluation of second – generation assay for detection of antibody to the hepatitis C virus. *Hepatology*, 15: 350 - 53, 1992b.

8. Anderson G, Powell L, Halliday J. Transferrin receptor distribution and regulation in the rat small intestine. *Gastroenterology*, 98: 576-85, 1990.
9. Asselah T, Martinot-Peignoux M, Levy S, Martins-Amado V, Marcellin P. Hypervariable region1 ( HVR1) quasispecies in patients with chronic hepatitis C and normal ALT. *Journal of Hepatology*, 30: 121, 1999 - Abstract.
10. Arber N, Konikoff F, Moshkowitz M. Increased serum iron and iron saturation without liver iron accumulation distinguish chronic hepatitis C from other chronic liver diseases. *Digestive Disease Science*;39: 2656-59, 1994.
11. Bacon B, Rebholz A, Fried M. Beneficial effect of iron reduction therapy in patients with chronic hepatitis C who failed to respond to interferon- $\alpha$ . *Hepatology*, 18: 150 A, 1993 - Abstract.
12. Barrera J, Francis B, Ercilla G. Improved detection of anti-HCV in post- transfusion hepatitis by a third generation ELISA. *Vox Sang*;68: 15-18, 1995.
13. Bassit L, Saéz-Alquésar A. Genotipagem do Vírus da hepatite C. *Newlab* 44-46,1995.
14. Bassit L, Vanderborght B, Dorlhiac-Ilacer P, Chamone D, Saéz-Alquésar A. Anti-HCV cPCR positivity, and HCV subtypes among screening positive blood donor from São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; 98:27.Supl.I,1994.
15. Beinker N, Voigt D, Arendse M, Smit J, Stander I, Kirsch R. Threshold effect of liver iron content on hepatitis inflammation and fibrosis in hepatitis B and C. *Journal of Hepatology*;25: 633-8, 1996.

16. Benvegna L, Gios M, Boccato S, Alberti A. Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. *Gut*;53(5):744-9, 2004.
17. Bessoda P and Poynard T, for The METAVIR Cooperative study Group. An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. *Hepatology*, 24: 289-93, 1996.
18. Bessoda P. The French METAVIR cooperative Study Group – *Hepatology*, 20: 15-20,1994.
19. Blumberg B, Lustbader E, Whitford P. Changes in serum iron levels due to infection with hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA*; 78:3222-24, 1981.
20. Bonkovsky H and consensus Interferon Study Group. Reduction of Health-related Quality of Life in Chronic Hepatitis C and Improvement With Interferon Therapy. *Hepatology*;29:264-70, 1999.
21. Bonkovsky H. Porphyrinuria cutânea tarda, hepatitis C and HFE gen mutations in north America. *Hepatology*;27:1661- 69,1998.
22. Booth J , O'Grady J, Neuberger J. Clinical Guidelines on the management of hepatitis C. *Gut*; 49(suppl I): i1-i21, 2001.
23. Boucher E, Bourienne A, Adams P, Turlin B, Brissot P, Deugnier Y. Liver iron concentration and distribution in chronic hepatitis C before and after interferon treatment. *Gut*; 41: 115-120, 1997.

24. Boyer N and Marcellin P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 32(suppl.1): 98-112- (34), 2000.
25. Brandão A, Fuchs S. Risk factor for hepatitis C virus infection among blood donors in southern Brazil: A case – control study. *BMC Gastroenterology*, 2:18, 2002.
26. Bukh J, Miller R, Purcell R. Genetic heterogeneity of hepatitis C: quasispecies and genotypes. *Seminars of Liver Diseases*, 15:41-63, 1995.
27. Busek S, Oliveira G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 2(1):117-23, 2003.
28. Cha T, Beall E, Irvine B, Kolberg J, Chein D, Kuo G, Urdea M. At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 89: 7144-48, 1992 [ Abstract]).
29. Chamberlain R, Adams N, Saeed A, Simmonds P, Elliott R. Complete nucleotide sequence of a type 4 hepatitis C virus variant, the predominant genotype in the Middle East. *Journal of Genetic and Virology*.; 78: 1341-47, 1997- Abstract.
30. Choo Q, Kuo G, Weiner A, Overby L, Bradley D, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood- borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244:359-62, 1989.
31. Corny-Cantilena C, VanRaden M, Gibble J, Melpolder J, Shakil O, Viladomiu L, Cheung L, DiBisceglie A, Hoofnagle J, Shih J, Kaslow R, Ness P, Alter H. Route interferon, viremia and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection *New England Journal of Medicine*, 334: 1691-96, 1996.

32. Courouce A-M, Bouchardeau F, Girault A, Le Marrec N. Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV antibody. *Lancet*; 343:853-4, 1994.
33. Cribier B, Rey D, Schimitt C, Lang J.M, Kirn A, Stroll-Keller F. High hepatitis C viraemia and impaired antibody response in patients coinfecting with HIV. *AIDS*;9:1131-36, 1995.
34. Dantas T, Cotrim H, Nascimento L, Braga L, Freitas C, Paraná R, Freitas L. Nonalcoholic steatohepatitis and iron overload: clinical and histologic evaluation. *GED Gastroenterol. Endosc. Dig*; 21(5): 207-12, 2002.
35. Delaporte E, Thiers V, Dazza M, Romeo R, Mlika-Cabanne N, Aptel I, Schrijvers D, Brechot C, Larouze B. High level of hepatitis C endemicity in Gabon, Equatorial Africa *Trans R Soc Trop Med*;87:636-37, 1993 - Abstract.
36. Desmed V. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology*;19:1513-20, 1994.
37. Deugnier Y, Turlin B, Lóreal O. Iron and Neoplasia. *Journal of Hepatology*;28:21-5, 1998.
38. Di Bisceglie A, Axiotis C, Hoofnagle J, Bacon B. Measurements of Iron Status in Patients with Chronic Hepatitis. *Gastroenterology*;102:2108-13, 1992.
39. Dourakis S, Brown J, Kumar U. Serological response and detection of viraemia in acute hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*; 14: 370-6, 1992.
40. Dow B, Follett E, Jordan T, McOmish F, Davidson J, Gillon J, Yap P, Simmonds P. Testing of blood donations for hepatitis C virus. *Lancet*;343:477-8, 1994.

41. Dusheiko G, Schmilovitz- Weiss H, Brown D. Hepatitis C virus genotypes an investigation of types-specific differences in geographics origin and disease. *Hepatology*,19: 13-8, 1994.
42. Enomoto N, Sakuma I, Asahuna Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C. Mutations in the nonstructural protein 5 A and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *New England Journal of Medicine*, 334:77-81, 1996.
43. Esteban J, Viladomiu L, Gonzales A. Hepatitis C antibodies among risk group in Spain. *Lancet*, 334:284-97, 1989.
44. Farci P, Munoz S, Shimoda A. Hepatitis C Virus associated fulminant hepatic failure. *New England Journal of Medicine*, 335:631-4, 1996.
45. Fattovich G, Giustina G, Degos F, Diodati G, Tremolada F, Nevens F, Almasio P, Solinas A, Brouwer J, Thomas H, Realdi G, Corrocher R, Schalm W. Effectiveness of interferon alpha on incidence of hepatocellular carcinoma and descompensation in European patients with cirrhosis tipo C. *Journal of Hepatology*, 27:201-5, 1997a.
46. Fattovich G, Giustina G, Degos F Tremolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, Solinas A, Mura D, Brouwer J, Thomas H, Njapoum C, Casarin C, Bonetti P, Fuschi P, Basho J, Tocco A, Bhalla A, Galassi R, Noventa F, Schalm S, Realdi G. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis Type C: A retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology*,112:463-72, 1997b.

47. Feder J, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy D, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis M, Fullan A, Hinton LM, Jones N, Kimmel B, Kronmal G, Lauer P, Lee V, Loeb D, Mapa F, McClelland E, Meyer M, Mintier G, Moeller N, Moore T, Morikang E, Wolff R. A novel MHC class 1-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*;13: 399-409, 1996.
48. Fisher H, Elmar W, Erhard B, Ulrich P. Histopathologic findings in chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*; 24 (suppl. 2): 35-42, 1996.
49. Follett E, Dow B, McOmish F, Lee Yap p, Hughes W, Mitchell R, simmonds P. HCV confirmatory testing of blood donors. *Lancet*; 338:1024, 1991.
50. Frank C, Mohamed M, Strickland G, Lavanchy D, Arthur R, Magder L, Khoby T, Abdel-Wahab Y, Ohn ES, Anwar W, Sallam I. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt, *Lancet*; 355:887-91, 2000.
51. Garson J, Ring C, Tuke P. Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. *Lancet*; 336:878-9, 1990.
52. George D, Goldwurm S, MacDonald G, Cowley L, Walker N, Ward P, Jazwinska G, Powell L. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology*, 114: 311-18, 1998.
53. Gerlach J. Acute hepatitis C: natural course and response to antiviral treatment *Hepatology*, 34: 341 A, 2001.
54. Gholson C, Morgan K, Catinis G, favrot D, Taylor B, Gonzales E, Balart L. *The American Journal of gastroenterology*;92:1788-92, 1997.

55. Gilli P, Moretti M, Soffritti S, Menini C. Anti- HCV positive patients in dialysis units *Lancet*; 336: 243-4, 1990.
56. Goffin E, Pirson Y, Cornu C, Jadoul M, Van Ypersele de Strihou C. Significance of NS3 and NS5 antigens screening for HCV antibody. *Lancet*; 343: 854, 1994.
57. Gonzalez-Peralta R, Qian K, She J, Davis G, Ohno T, Mizokamii M, Lao J. Clinical implications of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C. *Journal of Medical Virology*;49: 242-7, 1996.
58. Gonzales-Peralta R, Davis G, Lau J. Pathogenetic mechanism of hepatocellular damage in chronic hepatitis C infection. *Journal of Hepatology*;21: 255-9, 1994.
59. Gualdi R, Casalgrandi G, Montousi G, Ventura E, Pietrangelo A. Excess iron into hepatocytes is required for activation of collagen type I gene during experimental siderosis. *Gastroenterology*;107:1118-24, 1994.
60. Guimarães T, Granato C, Varella D, Ferraz M, Castelo A, Kalas E. High prevalence of hepatitis C infection in a brazilian prison: Identification of risk factors for infection. *Brazilian Journal Infection Disease*; 5(3):111-8, 2001.
61. Haber MM, West A, Haber A, Reuben A. Relationship of aminotransferases to liver histological status in chronic hepatitis C *The American Journal of gastroenterology*; 90: 1250- 57, 1995.
62. Haddad J, Deny P, Münz-Gotheil C, Ambrosini JC, Trinchet JC, Pateron D, Mal F, Callard P, Beaugrand M. Lymphocytic sialoadenitis of Sjogren ´ s Syndrome associated a chronic hepatitis disease C virus liver disease. *Lancet*;339: 321-3, 1992.



63. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine, 2<sup>nd</sup> ed. Oxford. *Oxford University Press*, 1989.
64. Hernandez M, Bruguera M, Puyuelo T, Barrera J, Sanchez J, Rodes J. Risk of needle-stick injuries in the transmission of hepatitis C virus in hospital personnel. *Journal of Hepatology*;16:56-8, 1992.
65. Hess G, Massing A, Rossol S, Schütt H, Clemens R, Meyer zum Büschenfelde K. Hepatitis C virus and sexual transmission. *Lancet*; 334: 987, 1989.
66. Hezode C, Cazeneuve C, Coué O, Roudot-Thoraval F, Lonjon I, Bastie A, Duvoux C, Pawlotsky JM, Zafrani E-S, Amselem S, Dhumeaux D. Liver accumulation in patients with chronic active hepatitis C: prevalence and role of hemochromatosis gene mutations and relationship with hepatic histology lesions. *Journal of Hepatology*;31: 979-84, 1999.
67. Hofer H, Osterreicher C, Jessner W, Penz M, Steindl-Munda P, Wrba F, Ferenci P. Hepatic iron concentration does not predict response to standard and pegylated INF/ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *Journal of hepatology*, 40(6): 1018-22, 2004.
68. Hoofnagle J NIH Consensus development Conference on Management of hepatitis C: *Hepatology*. 21-2, 2002.
69. Hoofnagle J. Hepatitis C: The clinical spectrum of disease. *Hepatology*, 26 ( 3 suppl 1); 15S-20S, 1997.

70. Hsu H, Wright T, Iuba D, Martin M, Feinstone S, Garcia G, Greeberg H. Failure to detect hepatitis C virus genome in human secretions with the polymerase chain reaction. *Hepatology*;14(5):763-7, 1991.
71. Hyaashi H, Takikawa T, Nishimura N, Yano M. Improvement of serum aminotransferase levels after phlebotomy in patients with chronic active hepatitis C and excess hepatic iron. *The American Journal of Gastroenterology*; 89: 986-8, 1994.
72. Ikura Y, Morimoto H, Johmura H, Fukui M, Sakurai M. Relationship between hepatic iron deposits and response to Interferon in Chronic Hepatitis C. *The American Journal of Gastroenterology*, 91:1367-73, 1996.
73. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H. Histologic grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology*;22: 696-9, 1995.
74. Johnson R, Gretch D, Yamabe H, Hart J, Bacchi C, Hartwell P, Couser W, Corey L, Wener M, Alpers C, Willson R. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine*;328:465-70, 1993.
75. Kazemi-Shirazi L, Datz C, Maier-Dobersberger T, Kaserer K, Hackl F, Polli C, Steindl P, Penner E, Ferenci P. The Relation of Iron Status and Hemochromatosis Gene Mutations in Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*; 116: 127-34, 1999.
76. Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Nakano Y, Furuta S, Nishioka K, Purcell R, Alter H. Hepatitis C in hospital employees with needle stick injuries. *Annals Internal Medicine*; 115: 367-9, 1991.

77. Kondell R, Ishak K, Black W, Chen T, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan T, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*, 1:431-5, 1981.
78. Kolykhalov A, Mihalik K, Feinstone S, Rice C, Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *Journal of Virology*, 74:2046-51, 2000.
79. Kolykhalov A, Agapov E, Blight K, Mihalik K, Feinstone S, Rice C. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*, 277: 570-4, 1997.
80. Kuo G, Choo Q, Alter H, Gitnik G, Redeker A, Purcell R, Miyamura T, Dienstag J, Alter M, Stevens C. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*; 244: 362-4, 1989.
81. Lamoril J, Lunel F, Laurent-Puig P, Laurent-Puig, Defer C, Loiseau P, Lefrere J, Pawlotsky J, Marcellin P, Bouchardeau F, Bogard M. Indeterminate third-generation recombinant immunoblot assay in hepatitis C virus infection. Group d'Etudes Moleculaires des Hepatites. *Journal of Hepatology*; 21: 133-4, 1994.
82. Lauer G, Walker B. Hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine*; 345: 41-50, 2001.
83. Lee J, Stripf T, Roth W, Zeuzem S. Non-isotopic detection of hepatitis C virus quasispecies by single-strand conformation polymorphism. *Journal of Medical Virology*, 53:245-51, 1997.

84. Legler T, Riggert J, Simson G, Wolf C, Humpe A, Munzel U, Uy A, Kohler M, Heermann K. Testing of individual blood donations for HCV-RNA reduces the residual risk of transfusion-transmitted HCV infection. *Transfusion*;40 (10):1192-97, 2000.
85. Le Guen B, Squadrito G, Nalpas B, Berthelot P, Pol S, Brechot C. Hepatitis C virus genome complexity correlates with response to Interferon therapy: a study in French patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*;25: 1250-54, 1997.
86. Lerat H, Berby F, Trabaud M, Vidalin O, Major M, Trepo C, Inchauspe G. Specific detection of hepatitis C minus strand RNA in haematopoietic cells. *Journal of Clinical Investigation*; 97:845-51, 1996.
87. Liang T, Rehermann B, Seeff L, Hoofnagle J. Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of Hepatitis C. *Annals of Internal Medicine* ; 132:296-305, 2000.
88. Lohmann V, Koch J, Bartenschlager R. Processing pathway of the hepatitis C virus proteins. *Journal of Hepatology*;24[suppl.2]: 11-19, 1996.
89. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*;285:110-13, 1999.
90. Lowes K, Brennan B, Yeoh G, Olynyk J. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *The American Journal of Pathology*; 154(2):537-41, 1999.

91. Ludwig J. The nomenclature of chronic active hepatitis: an obituary *Gastroenterology*, 105(1):274-8, 1993.
92. Lunel F. Hepatitis C virus and autoimmunity: fortuitous association or reality? *Gastroenterology*, 107(5): 1550-55, 1994.
93. Lyra LGC - Hepatite C: O desafio de um vírus. *Conduas em gastroenterologia*, São Paulo Vol. Pag. 28-33,2003.
94. Manns M, McHutchison J, Gordon S, Rustig V, Shiffman M, Reindollar R, Goodman Z, Koury K, Ling MH, Albrecht J and International Hepatitis Interventional Therapy Group. Peginterferon alfa 2b plus ribavirina compared with interferon alfa-2b plus ribavirina for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*;358: 958-65, 2001.
95. Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology*, 36 ( 5 suppl.1) S47- S56, 2002.
96. Marcellin P. Hepatitis C: clinical spectrum of the disease. *Journal of Hepatology*;31 (suppl. 1): 9-16, 1999a.
97. Marcellin P, Hezode C, Castelnau C, Barange K, Couzigou P, Larrey D. Randomized controlled trial of combination therapy with interferon (INF) alpha-2 a and ribavirin, in patients with chronic hepatitis C who relapsed after interferon therapy. *Hepatology*, 30 (suppl. 2): 192, 1999b. (Abstract).
98. Maher J, Zia S, Tzagarakis C. Acetaldehyde-induced stimulation of collagen synthesis and gene expression is dependent on conditions of cell culture: studies with a

- rat licytes and fibroblasts. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*; 18 (2): 403-9, 1994.
99. Martinot-Peignoux M, Marcellin P, Pouteau M, Castelnau C, Boyer N, Poliquin M, Degott C, Descombes I, Le Breton V, Milotova V. Pretreatment serum HCV RNA levels and HCV genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology*;22:1050-56, 1995.
100. Martinot-Peignoux M, Marcellin P, Branger M.HCV infection assessed with third generation anti-HCV testing and polymerase chain reaction. *Journal of Hepatology*; 18: s146, 1993.
101. Martell M, Esteban J, Quer J, Genesca J, Weiner A , Esteban R, Guardia J, Gomez J. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genome: quasispecies nature of HCV genome distribution. *Journal of Virology*; 66:3225-29, 1992.
102. Mathews G, Bhagani S. The epidemiology and natural history of HIV/HBV and HIV/HCV co-infections. *Journal of HIV Therapy*. 8(4): 77-84, 2003.
103. McHutchison J, Gordon S, Schiff E, Schiffman M, Lee W, Rustgi V, Goodman Z, Ling M, Cort S, Albrecht J. Interferon alfa 2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *The New England Journal of Medicine*;339 (21):1485-92, 1998.

104. McHutchinson J, Person J, Govindarajan S, Valinluck B, Gore T, Lee S, Nelles M, Pollito A, Chien D, DiNello R. Improved detection of hepatitis C virus antibodies in high-risk populations. *Hepatology*. 15 (1) 19-25, 1992.
105. McOmish, F, Chan S, Dow B, Gillon J, Frame W, Crawford R, Yap P, Follett E, Simmonds P. Detection of three types of hepatitis C in blood donor: investigation of type-specific differences in serologic reactivity and rate of alanine aminotransferase abnormalities. *Transfusion* ; 33(1): 7-13, 1993.
106. Medeiros M, Lima J, Campos H, Medeiros M, Coelho Filho J. Prevalence and associated factors to hepatitis C in hemodialysis patients in Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 38(2): 187- 93, 2004.
107. Melbye M, Biggar R, Wantzin P, Krogsgaard K, Ebbesen P, Becher N. Sexual transmission of hepatitis C virus: cohort study (1981-9) among European homosexual men. *British Medical Journal*, 301: 210-12, 1990.
108. Mellor J, Walsh E, Prescott L, Jarvis M, Davidson F, Yap P, Simmonds P. Survey of type 6 group variant of hepatitis C virus in Southeast Asia by using a core-based genotyping assay. *Journal of Clinical Microbiology*.; 34:417-23, 1996.
109. Mesquita P, Granat C, Castelo A . Risk factors associated with hepatitis C virus (HCV) infection among prostitutes and their clients in the city of Santos, São Paulo States, Brazil. *Journal of Medical Virology*, 51(4): 338-43, 1997.

110. Misiani R, Bellavita P, Fenili D, Vicari O, Marchesi D, Sironi P, Zilio P, Verocchi A, Massazza M, Vendramin G. Interferon alfa-2<sup>a</sup> therapy in cryoglobulinemia associated with hepatitis C virus. *The New England Journal of Medicine*; 330(11): 751-56, 1994.
111. Mitsui T, Iwano K, Masuko K, Yamazaki C, Okamoto H, Tsuda F, Tanaka T, Mishiro S. Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. *Hepatology*;16(5):1109-14, 1992.
112. Miyakawa Y, Mayumi, M. Hepatitis G Virus - A True Hepatitis Virus or an Accidental Tourist? *The New England Journal of Medicine*; 336: 795-96, 1997 Editorial.
113. Mondelli U, Cristina G, Filice G, Rondanelli E, Piazza V, Barbieri C. Anti-HCV positive patients in dialysis units. *Lancet*; 336;244, 1990.
114. Mutimer D, Harrison R, O'Donnell K, Shaw J, Martin B, Atrah H, Ala F, Skidmore S, Hubscher S, Neuberger J. Hepatitis C virus infection in the asymptomatic British blood donor. *Journal of Viral Hepatology*; 2: 47-53, 1995.
115. Nakatsuji Y, Matsumoto A, Tanaka E, Ogata H, Kiyosawa K. Detection of chronic hepatitis C virus infection by four diagnostic systems: first-generation and second – generation enzyme- linked immunosorbent assay second-generation recombinant immunoblot assay and nested polymerase chain reaction analysis. *Hepatology*;16: 300-5,1992.
116. Nainin J. Kupffer cell staining by a HFE - specific monoclonal antibody: implications for hereditary haemochromatosis. *British Journal Haematology*;103: 931-41, 1998.



117. Ogasawara S, Kage M, Kosai K, Shimamatsu K, Kojiro M. Hepatitis C virusRNA in saliva and breastmilk of hepatitis C carrier mothers. *Lancet*; 341: 561, 1993.
118. Olynyk J, Reddy K, Di Bisceglie A, Jeffers L, Parker T, Radick J, Schiff E, Bacon B. Hepatic Iron concentration as a predictor of response to interferon alfa therapy in chronic HCV. *Gastroenterology*;108:1104-09, 1995.
119. Ohto H, Terezawa S, Sasaki N, Sasaki N, Hino K, Ishiwata C , Kako M, Ujiie N, Endo C, Matsui A, Okamoto H, Mishiro S. Transmission of hepatitis C virus from mother to infants. *The New England Journal of Medicine*; 330:744-50, 1994.
120. Paraná R, Vitvitski L, Berby F, Portugal M, Cotrim H, Cavalcante A, Lyra L, Trego C. HCV Infection in northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3<sup>a</sup> and absence of African genotypes. *Arquivo de gastroenterologia*; 37(4): 231- 61, 2000.
121. Pawlotsky J, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Durval J, Dhumeaux D. Relationships between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Infective Disease*; 171:1607-10 (22), 1995.
122. Pawlotsky J, Pellerin M, Bouvier M, Roudot-Thoraval F, Germanidis G, Bastie A, Darthuy F, Remire J, Soussy C, Dhumeaux D. Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis virus. Influence on the characteristics of the infection and the response to alpha-interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Medical Virology*; 54: 256-64, 1998a.

123. Pawlotsky J, Bouvier-Alias M, Hezode C, Darthuy F, Remire J, Dhumeaux D. Standardization of hepatitis C RNA quantification. *Hepatology*,32: 654-659, 2000.
124. Pawlotsky J. Use and interpretation of virologic Test. *Hepatology*,36 (5 suppl 1): S65-73 2002.
125. Pawlotsky J, Lonjon I, Hezode C, Raynard B, Darthuy F, Remire J, Soussy C, Dhumeaux D. Wath strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology*, 27:1700-02, 1998b.
126. Pawlotsky J, Ben Yahia M, Andre C, Voisin M, Intrator L, Roudot- Throraval F, Deforges L, Duvoux C, Zafani E, Durval J. Immunological Disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case – control study. *Hepatology*, 19: 841- 6, 1994 .
127. Pereira B, Milford E, Kirkman R, Levey A. Transmission of hepatitis C virus by organ transpantation. *The New England Journal of Medicine*, 325: 454-460, 1991.
128. Pietrangelo A. Metals, oxidative stress, and hepatic fibrogenesis. *Seminars of Liver Disease*,16:13-30, 1996.
129. Pietrangelo A. Iron, oxidative stress and liver fibrogenesis. *Journal of Hepatology*,28:8-13, 1998.
130. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner A, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*,282:938-41, 1998.
131. Piperno A, Sampietro M, Pietrangelo A, Arosio C, Lupica L, Montosi G, Vergani A, Fraquelli M, Girelli D, Pasquero P, Roetto A, Gasparini P, Fargion S, Conte D,

Camaschella C. Heterogeneity of Hemochromatosis in Italy. *Gastroenterology*, 114:996-1002, 1998.

132. Piperno A, D'Alba R, Fargion S, Roffi L, Sampietro M, Parma S, Arosio V, Fare M, Fiorelli G. Liver Iron concentration in chronic viral hepatitis: a study of 98 patients. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 7: 1203-08, 1995.

133. Piperno A, Sampietro M, D'Alba R, Roffi L, Fargion S, Parma S, Nicoli C, Corbetta N, Pozzi M, Arosio V, Boari G, Fiorelli G. Iron stores, response to interferon therapy and effect of iron depletion in chronic hepatitis C. *Liver*; 16;248-54, 1996.

134. Popper H, Schaffner F. The Vocabulary of Chronic hepatitis. *The New England Journal of Medicine*; 284:1154-56, 1971.

135. Puoti C, Magrini A, Stati T, Rigato P, Montagnese F, Rssi P, Aldegheri L, Resta S. Clinical, histological, and virological features of hepatitis C virus Carriers with persistently normal or abnormal alanine trasaminases levels. *Hepatology*, 26 (6): 1393-98, 1997.

136. Poynard T, Marcellin P, Lee S, Niederau C, Minuk G, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J. Randomised trial of interferon alpha 2b plus ribavirina for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of crhonic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Intervention Therapy Group (IHIT). *Lancet*; 352: 1426-32, 1998.

137. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet*; 349: 825-32, 1997.

138. Poynard T, Leroy V, Cohard M, Thevenot T, Mathurin P, Opolon P, Zarski JP. Meta-analysis of interferon randomised trial in the treatment of viral hepatitis C: effects of dose and duration. *Hepatology*,24: 778-89, 1996.
139. Prince M, Hudson M. Liver transplantation for chronic liver disease: advances and controversies in na era of organ shortages. *Postgraduate Medical Journal*, 78: 135-41, 2002.
140. Qu, D, Li J Vitvitski L, Mechai S, Berby F, Tong SP, Bailly F, Wang QS, Martin JL, Trepo C. Hepatitis C virus genotypes in France: comparasion of clinical features of patients infected with HCV type I and type II. *Journal of Hepatology*, 21: 70-5, 1994.
141. Ray KIM W. The Burden of Hepatitis C in the United States. Management of hepatitis C:2002 NIH Consensus Development Conference. *Hepatology*.23-6, 2002.
142. Riggio O, Montagnese F, Fiore P, Folino S, Giambartolomei S, Gandin C, Merli M, Quinti I, Violante N, Caroli S, Senofonte O, Capocaccia L. Iron Overload in patients with Chronic Viral Hepatitis: How Common is it? *The American Journal of Gastroenterology*;92:1298-01, 1997.
143. Roggendorf M, Lu M, Riffelmann M, Meisel H, Schreir E, Viazov S. Rational use of diagnostic tools in hepatitis C. *Journal of Hepatology*;24 [Suppl. 2]: 26-34, 1996.
144. Roudot-Thoraval F, Bastie A, Pawlotsky J, Dhumeaux D. Epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus- related liver disease: a French survey of 6,664 patients. *Hepatology*, 26: 485-90, 1997.

145. Santana G. Anti-HCV em pacientes sob programa de hemodialise-Salvador-Ba. Salvador, 1995. Dissertação (*Mestrado em Medicina Interna*). Faculdade de Medicina da Universidade federal da Bahia. 1995.
146. Santana N. Significado do anti-HCV em doadores de sangue na cidade do Salvador -Ba. Dissertação (*Mestrado em Medicina Interna*). Faculdade de Medicina da Universidade federal da Bahia, 1995.
147. Sartori M, Adorno S, Rigamonti C, Boldorini R. Chronic hepatitis C treated with phlebotomy alone: Biological and Histological outcome. *Digestive and Liver Disease*;33:157-62, 2001.
148. Sayers MH, Gretch DR. Recombinant immunoblot and polymerase chain reaction testing in volunteer whole blood donors screened by a multi-antigen assay for hepatitis C virus antibodies. *Transfusion*;33:809-13, 1993.
149. Scaraggi F, Lomuscio S, Perricci A, De Mitrio V, Napoli N, Schiraldi O. Intrafamilial and sexual transmission of hepatitis C virus. *Lancet*; 342: 1300-01, 1993.
150. Schreiber G, Busch M, Kleimman S, Korelitz J. The risk of transfusion-transmitted viral infection. *The New England Journal of Medicine*;334: 1685-90, 1996.
151. Seeff L, Natural history of hepatitis C. *The American Journal of Medicine*; 107:10S-15S, 1999.
152. Seeff L, Buskell-Bales Z, Wrght E, Durako S, Alter H, Iber F, Hollinger F, Gitnick G, Knodell R, Perrillo R. Long-term mortality after transfusion-associated non-A, non-B

- hepatitis. The National Heart, Lung, and Blood Institute Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 327: 1906-11, 1992.
153. Seeff L. National Institute of Health Consensus Development Conference: Management of Hepatitis C: *Hepatology*, 36 (5 suppl 1): S1- S2, 2002.
154. Shimizu Y, Weiner A, Rosenblatt J, Wong D, Shapiro M, Popkin T, Houghton M, Alter H, Purcell R, Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzee. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*;: 6441-4, 1990.
155. Silini E, Bottelli R, Asti M, Bruno S, Candusso M, Brambilla S, Bono F, Iamoni G, Tinelli C, Mondeelli M, Ideo G. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: A case control study. *Gastroenterology*, 111:199-205, 1996.
156. Silva L, Paraná R, Souza S, Berby F, Kay A, Trepo C, Santana N, Cotrim H, Lyra L, Reis M. Hepatitis C virus genotypes in a northeastern area of Brasil. *The American Journal of tropical Medicine and Hygiene*;62(2): 257-60, 2000.
157. Simmonds P, McOmish F, Yap P, Chan S, Lin C, Dusheiko G, Saeed A, Holmes E. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on the sequence diversity. *Journal of Genetic and Virology*, 74: 661-8, 1993.
158. Simmonds P, Alberti A, Alter H, Bonino F, Bradley D, Brechot C, Brouwer J, Chan S, Chayama K, Chen D. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*; 19:1321-24, 1994.
159. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology*;21: 570-83, 1995.

160. Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver. *Seminars Liver Disease*, 10:01- 10, 1990.
161. Sutnik A. Elevated serum iron levels and persistent Australia antigen(HbsAg). *Annals Internal Medicine*, 81: 855-56, 1974.
162. Tabor E, Drucker J, Hoofnagle J, April M, Gerety R, Seeff L, Jackson D, Barker L, Pineda - Tamondong G. Transmission of Non-A Non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet*;4: 463-65, 1978.
163. Tedder R, Gilson R, Briggs M, Loveday C, Cameron C, Garson J, Kelly G, Weller I, Hepatitis C virus: Evidence for sexual transmission. *British Medical Journal*, 302:1299-02, 1991.
164. Tokita H, Okamoto H, Tsuda F, Song P, Nakata S, Chosa T, Iizuka H, Mishiro S, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis C virus variant from vietnam are classifiable into the seventh, eighth and ninth major genetic groups. *Proc Natl. Acad Sci USA*; 91: 11022-26, 1994.
165. Tokita H, Okamoto H, Iizuka H, Kishimoto J, Tsuda F, Lesmana A , Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis C virus variant from Jakarta, Indonesia classifiable into novel genotype in the second [2e and 2f), tenth [10 a] and eleventh ( 11 a) genetic group. *Journal of Genetic and Virology*, 77: 293-301, 1996.
166. Tokita H, Okamoto H, Iizuka H, Kishimoto J, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. The entire nucleotide sequences of three hepatitis C virus sequence genetic groups 7-

- 9 and comparison with those in the other eight genetic groups. *Journal of Genetic and Virology*, 79: 1847-57, 1998.
167. Tong M, El-Farra N, Reikes A, Co R. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *The New England Journal of Medicine*. 332: 1463-66, 1995.
168. Trinder D, Fox C, Vautier G, Olynky J. Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut*, 51:290-5, 2002.
169. Tsai N, Zucherman E, Han SH, Goad K, Redeker A, Fong TL. Effect of iron depletion on long-term response to interferon- $\alpha$  in patients with chronic hepatitis C who previously did not respond to interferon therapy. *The American Journal Gastroenterology*, 92:1831-34, 1997.
170. Tsukiayama- Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C. *Journal of Virology*, 66: 1476-83, 1992.
171. Tung B, Emond M, Bronner P, Raaka S, Cotler S, Kowdley K. Hepatitis C, iron status, and disease severity: Relationship with HFE mutation. *Gastroenterology*, 124:318-26, 2003.
172. Van Thiel D, Friedlander L, Fagiuoli S, Wright H, Irish W, Gavler J. Response to interferon alpha therapy is influenced by the iron content of the liver. *Journal of Hepatology*, 20: 410-5, 1994.
173. Vento S, Cainelli F. Does hepatitis C virus cause severe liver disease only in people who drink Alcohol? *Lancet Infective Disease*, 2(5): 303-9, 2002 – Abstract.



174. Vernelen K, Claeys H, Verhaerty H, Volckaerts A, Vermeylen C. Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV antibody. *Lancet*;343: 853, 1994.
175. Vrieling H, Reesink H, Van Den Burg P, Zaaijer H, Cuypers H, Lelie P, Van Der Poel C. Performance of three generations of anti-hepatitis C virus enzyme-linked immunosorbent assays in donors and patients. *Transfusion*;37: 845-49, 1997.
176. Weiner A, Kuo G, Bradley D, Bonino F, Saracco G, Lee C, Rosenblatt J, Choo QI, Houghton M. Detection of hepatitis C sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet*;335:1-3, 1990.
177. Wicki A, Joller-Jemelka H. Indeterminded hepatitis C. *Lancet*;341: 1534, 1993.
178. Yano M, Hayashi H, Wakusawa S, Sanae F, Takikawa T, Shiono Y, Arao M, Ukai K, Ito H, Watanabe K, Yoshioka K. Long term effects of phlebotomy on biochemical and histological parameters of chronic hepatitis C. *The American Journal of Gastroenterology*;97:133-7, 2002.
179. Wright T, Hollander H, PuX, Held M, Lipson P, Quan S, Polito A, Thaler M, Bacchetti P, Scharschmidt B. Hepatitis C in HIV-infected patients with and without AIDS: Prevalence and relationship to patients survival. *Hepatology*;20; 1152-55, 1994.
180. Zein N, Rakela J, Krawitt E, Reddy K, Tominaga T, Persing D and Collaborative Study group. Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. *Annal of Internal Medicine*; 125: 634-9, 1996.
181. Zein N. *Clinical Microbiology Review*, 13: 223-35, 2000.

182. Zeuzem S, Franke A, Lee J, Heermann G, Ruster B, Roth W. Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates and their correlation to viremia, liver function tests and Histology. *Hepatology*;1003-9, 1996.
183. Zucherman A. The elusive hepatitis C virus. *British Medical Journal*; 299:871-3, 1989.
184. Zuckerman E, Zuckerman T, Levine A, Douer D, Gutekunst K, Mizokami M, Qian D, Velankar M, Nathwani B, Fong TL. Hepatitis C virus infection in patients with B-cell non Hodgkin lymphoma. *Annals of Internal Medicine*; 127:423-8, 1997.



# **ANEXOS**

**Successful Daily Dose Interferon Alfa-2A Therapy Over 24 Weeks in Chronic HCV- Infected Patients with Gentype-3**

Authors: Perdita Wietzke Braun; Volker Meier; Katrin Neubauer Saile; Felix Braun; Giuliano Ramadori  
GERMANY

**Chronic Hepatitis C Virus Infection in Dialysis Patients: Relationship Between Histological Abnormalities and Levels of ALT and Gamma GT (GGT)**

Authors: Alessandra Bisio; Adalgisa Paiva Ferreira; Renata Mello Perez; Miguel Cendoroglo Neto; Valeria Pereira Lanzoni; Maria Lucia Gomes Ferraz; Antonio Eduardo Benedito Silva  
BRAZIL

**Impact of Previous Hepatitis B Virus (HBV) Infection on Fibrosis Staging in Patients with Chronic Hepatitis C**

Authors: Roberto J. de Carvalho Filho; Fábio Pace; Valeria Pereira Lanzoni; Maria Lucia Gomes Ferraz; Antonio Eduardo Benedito Silva  
BRAZIL

**Distribution of Hepatitis C Virus Genotypes in Georgia**

Authors: David Metreveli; Rtskhiladse Irakli  
Co-Author: M Weizeneger  
GEORGIA

**Effect of Iron Load on the Severity of Liver Histologic Alterations and Response to Interferon Therapy of Patients with Hepatitis C Infection**

Authors: R C Marback; L Freitas; Andre C. Lyra; E L Braga; C Moraes; Luiz Guilherme Costa Lyra  
BRAZIL

**Iron Overload in Patients with Chronic HCV Infection: A Clinical, Laboratory and Histological Study**

Author: Ivonete Sandra de Souza Silva  
Co-Authors: Renata Mello Perez; Pedro Oliveira; Maria Ines Cantagalo; Elizabeth Dantas; Cristina Sisti; Claudio Figueiredo Mendes; Valeria Pereira Lanzoni; Antonio Eduardo Benedito Silva; Maria Lucia Gomes Ferraz  
BRAZIL

**HCV-RNA Results at the 12th Week as a Predictive Factor of Sustained Virological Response in Chronic Hepatitis C Patients with Detectable Viremia in the 4th Week of Treatment with Alpha Interferon and Ribavirin**

Author: Cristiane Alves Villela Nogueira  
Co-Authors: Renata Mello Perez; Jorge André de Segadas Soares; Leticia Cancela Nabuco; Henrique Sérgio Moraes Coelho  
BRAZIL

**Health Related Quality of Life in Carriers of Hepatitis C Virus**

Authors: Maria Cristina Dias Teixeira; Maria de Fátima Gomes de Sá Ribeiro; Edna Strauss  
BRAZIL

**Conclusions:** According to our results, previous HBV infection may have a negative impact on the natural history of hepatitis C virus infection. This finding was independent of the presence of occult hepatitis B infection.

### Distribution of hepatitis C virus genotypes in Georgia

Irakli, R. Irakli & M. Weizenegger  
Healthcare Centre Mtskhvari, Georgia

**Background:** Hepatitis C is one of the major causes of chronic liver disease and successful treatment is partially dependent on the virus genotype. The hepatitis C virus genotypes are differently distributed in distinct geographical areas. We have not found any information in the literature about prevalence of hepatitis C virus in Georgia.

**Methods:** We reviewed retrospectively the cases of 385 patients (male 312 (81%), female 73 (19%)), age range 12–64 years, mean age 32.3 years, all inhabitants of Georgia, who admitted to the laboratory of medical healthcare centre 'Mtskhvari' (one of two centres in Georgia where it is possible to perform HCV RNA genotyping), from 09/2001 until 09/2003 with positive anti-HCV and confirmed HCV RNA analysis qualitatively. We followed the cases of patients who performed genotyping of HCV. All tests were performed in the laboratory of Dr Limbach, Heidelberg, Germany. Genotyping was done by polymerase chain reaction (PCR).

Total 385 patients performed HCV-RNA qualitative diagnosis. 246 (63%) were HCV-RNA positive. Forty-three HCV genotyping was performed. Eighteen (41.9%) patients were infected with HCV genotype 1 (subtype 1a-1 (2.4%) patient, subtype 1b 17 (88.6%) patients) – with genotype 2 (all of them subtype 2a) 17 (39.5%) with genotype 3 (all of them subtype 3a) 10 (23.6%) patients. Genotypes 4, 5 and 6 were not detected.

**Conclusions:** In Georgia, HCV genotypes 1 and 3 are the predominant genotypes in patients with hepatitis C. HCV genotype 1 is the most prevalent. HCV genotype 1, most resistant to modern treatment, is not exceeding 42%, and genotype distribution is homogenous. These findings may have implications for predicting outcome for interferon therapy. Further prospective study with involvement of more patients is needed.

### Effect of iron load on the severity of liver histological alterations and response to interferon therapy of patients with hepatitis C infection

Freitas, L. A. Freitas, A. C. Lyra, E. Braga, C. Moraes & L. G. Lyra  
Gastro-Hepatologia do H. São Rafael e University Fed Bahia, Salvador, Brazil

**Background:** Hepatitis C infection may progress to chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. Risk factors associated with more severe clinical progression are male gender, alcohol consumption and coinfection with HIV and HBV. Recently, the role of iron load has been under evaluation.

**Aim:** To determine hepatic iron load in patients with chronic HCV infection and to correlate with HCV genotypes and with liver histological alterations. To evaluate the influence of iron load in response to interferon and ribavirin therapy.

**Methods:** We evaluated histological liver samples of 95 patients with chronic hepatitis C infection. Patients were divided into 2 groups: G1 – presence of iron load at hepatic tissue. GII – absence of iron load. Liver histological alterations were analysed using the METAVIR system. We excluded patients with a history of alcohol abuse, blood transfusion in the previous 90 days, haemochromatosis, haemophilia and coinfection with HBV, HIV.

**Results:** Patients mean age was 46 years (27–62). There were 71 males (74.7%). Sixty-nine out of 95 individuals were subjected to HCV genotyping. HCV genotype 1 infection was detected in 70.1% of cases. Eighty-five patients were treated with combination of interferon 2α and ribavirin and body mass index (BMI) was documented in 51. Thirty patients comprised G-I, and 65, G-II. Iron load was detected in 36.6% of males and 16.7% of females ( $P = 0.069$ ), in 14 patients (28.6%) infected with HCV genotype 1 as compared to 6 (30%) infected with non-1 genotype ( $P = 0.906$ ), and in 42.3% of patients with BMI = 25 compared with 24% of those with BMI > 25 ( $P = 0.166$ ). Iron load was more frequently encountered in liver tissue of patients with a more severe stage of fibrosis: 4.35% of individuals with METAVIR score F0, F1, 41.2% of those with stage F2, F3 and 38.1% of patients with stage F4 ( $P = 0.005$ ). Twenty-eight out of 85 treated patients (32.9%) had SVR and 8 (28.57%) of them had hepatic iron load. Among the 57 non-responders, tissue iron accumulation was detected 31.7% ( $P = 0.73$ ).

**Conclusions:** Hepatic iron load was observed in 31.6% of patients with hepatitis C, especially males. There was no association between HCV genotype and iron load. A greater iron accumulation was associated with a more severe stage of liver fibrosis. These results indicate the need for larger multicenter studies to evaluate the role of iron load and clinical outcome in patients with chronic hepatitis C.

### P-169

#### Iron overload in patients with chronic HCV infection: a clinical, laboratory and histological study

Silva, I. S. S. Silva, R. M. Perez, P. Oliveira, M. I. Cantagalo, E. Dantas, C. Sisti, C. F. Mendes, V. P. Lanzoni, A. E. B. Silva & M. L. G. Ferraz  
Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Brazil

**Background:** Recently, the role of iron has been pointed out as an important element in the natural history of hepatitis C. Serum markers of iron stores are frequently increased in chronic HCV-infected carriers but the real impact of the hepatic iron overload is poorly understood.

**Aim:** To determine the prevalence of iron overload and to study the relationship between hepatic iron concentration (HIC) and demographic, laboratory and histological characteristics in chronic HCV-infected carriers.

**Methods:** Patients presenting anti-HCV and HCV-RNA were included. Hepatic iron concentration was determined in liver tissue by atomic absorption spectrophotometry. The association between HIC and age, gender, risk factor of transmission, duration of infection, AST and ALT levels, iron and serum ferritin, transferrin saturation, HCV RNA level, grading of inflammatory activity, staging of fibrosis, hepatic steatosis and stainable iron was analysed. Statistical analysis included the Mann-Whitney test and a multiple linear regression model.

**Results:** Ninety-six patients (58% males) with a mean age of  $44 \pm 10$  years were studied. Serum iron, ferritin and transferrin saturation were elevated in 28, 27 and 12.5%, respectively. Stainable iron was detected in few patients (15.6%). Higher grades of stainable iron (2 and 3) were observed in only 7%. HIC ( $>30 \mu\text{mol/g dry wt}$ ) was elevated in five (5%) patients. Neither grading nor staging were related to HIC values. Higher HIC values were observed in males ( $P < 0.001$ ), in patients with elevated serum ferritin ( $P = 0.001$ ) and in patients with stainable iron (grades 2 and 3) ( $P = 0.001$ ). Multiple linear regression analysis showed that only stainable iron was independently correlated with HIC values ( $P = 0.003$ ).

**Conclusions:** Iron overload in chronically HCV-infected patients was uncommon and hepatic iron content seemed not to be related to the liver damage process. In the eventuality of iron overload, histochemical liver iron is a useful marker to estimate HIC.

# Brazilian Journal of Medical and Biological Research

## Instructions for Authors

### GENERAL INFORMATION

Scope and Policy

Page Charges

Manuscript criteria and Information

Categories of Articles

Criteria for Manuscript Acceptance

Authorship Information

Editorial Review and Processing

### MANUSCRIPT PREPARATION

Manuscript Preparation

Text Format

Cover letter

Title page

Running title

Key words

Abstract

Writing a Good Abstract

Headings in Text

Abbreviations and Symbols

Units

Introduction

Material and Methods

Results

Discussion

Acknowledgments

Tables

Figures

References

Manuscript Checklist

---

## Scope and Policy

The purpose of the BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH is to publish the results of original research that contribute significantly to knowledge in medical and biological sciences.

Preference will be given to manuscripts that develop new concepts or experimental approaches and are not merely repositories of scientific data.

Methodological papers shall be considered for publication provided they describe new principles or a significant improvement of existing methods. Papers that report preliminary results or are only confirmatory in nature will not be accepted for publication.

When appropriate, papers in the area of Clinical Investigation should include a statement indicating that the protocol has been approved by the Hospital Ethics Committee (Hospital with which at least one of the authors is associated).

---

## **Page Charges**

The Journal will bill authors for "page charges" for all accepted papers submitted after October 1, 2003. The charge will be R\$960/paper for Brazilian authors and US\$320/ paper for authors outside Brazil.

All authors are expected to pay the "page charges". However, the fee will be waived if the authors contact the Journal with an appropriate justification. Page charges will be billed to the Author for Correspondance at the time the galley proofs of the paper are sent. In Brazil, payment should be made by bank deposit and outside Brazil payment should be made by check in dollars drawn on an American bank. Please contact Reinaldo de Souza ([bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br)) if you have any questions.

## **Manuscript Criteria and Information**

The *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* is a peer-reviewed journal published monthly by the Brazilian Association of Scientific Divulcation (ABDC).

**Manuscript Submission.** The Journal prefers manuscript submission via e-mail ([bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br))

If this is not possible, manuscripts, accompanied by all supporting materials, should be mailed, with adequate protection for figures, to:

**Brazilian Journal of Medical and Biological Research  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Av. Bandeirantes, 3900  
14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil**

### **Telephone and Fax**

**Brazil: (0XX) 16-633-3825**

**Others: 55-16-633-3825**

**E-mail: [bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br)**

Submission of a manuscript to the *Brazilian Journal* implies that the data have not been published previously and will not be submitted for publication elsewhere while the manuscript is under review. The following are considered to represent "prior publication": any printed material in excess of 500 words describing results or methods of a submitted/in press manuscript; published tables or illustrations that duplicate the content of a manuscript; or electronic manuscripts or posters available via the Internet. When part of the material has been presented in a preliminary communication or in an unrefereed symposium, this should be cited as a footnote on the title page and a copy should accompany the submitted manuscript.

---

## **Categories of Articles**

The Journal publishes Full-length Papers, Short Communications, Review Articles, and sections containing Concepts and Comments, Overviews, Recollections and Reports of Scientific Meetings. The most frequent categories of articles are described herein.

The content of the *Brazilian Journal* is organized into sections. **Authors should specify the section they prefer for their submission in the cover letter.**

- Biochemistry and Molecular Biology
- Cell Biology
- Clinical Investigation
- Experimental Biology
- Immunology
- Neurosciences and Behavior
- Pharmacology
- Physiology and Biophysics

**Full-length Paper.** Each manuscript should clearly state an objective or hypothesis; the design and methods (including the study setting and time period, patients or participants with inclusion and exclusion criteria, or data sources and how these were selected for the study); the essential features of any interventions; the main outcome measures; the main results of the study; a comment section placing the results in the context of published literature, and the conclusions. It should contain:

- an abstract of no more than 250 words
- no more than 6 key words
- a running title
- the text should be divided into separate sections (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion)
- no more than 40 references
- authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a Full-length Paper

**Short Communication.** A short communication is a report on a single subject which should be concise but definitive. Pairs or sequences of papers will not be allowed. The scope of this section is intended to be wide and to encompass methodology and experimental data on subjects of interest to the readers of the Journal. It should contain:

- an abstract of no more than 250 words
- no more than 6 key words
- a running title



- text not exceeding 9 double-spaced typed pages of 23 lines each (excluding references)
- a maximum of 2 figures or tables (or one figure and one table)
- no more than 20 references
- a Short Communication should not be divided into separate sections (Introduction, Methods, etc.)
- authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a Short Communication

**Review Article.** A review article by investigators who have made substantial contributions to a specific area in medical and biological sciences will be published by invitation of the Editors. However, an outline of a review article may be submitted to the Editors without prior consultation. If it is judged appropriate for the Journal, the author(s) will be invited to prepare the review article for publication. A review article should contain:

- an abstract of 250 words or less
- no more than 6 key words
- a running title
- no more than 60 references
- the text should be divided into sections with appropriate titles and subtitles (Headings in text)

---

## **Criteria for Manuscript Acceptance**

Major criteria for acceptance are scientific quality, originality, and conciseness. Preference will be given to manuscripts that develop new concepts or experimental approaches and are not merely repositories of scientific data. Methodological papers shall be considered for publication provided they describe new principles or a significant improvement of existing methods. Papers that report preliminary results or are only confirmatory in nature will not be accepted for publication.

---

## **Authorship Information**

**Authorship Requirements.** Only those persons who contributed directly to the intellectual content of the paper should be listed as authors. Authors should meet all of the following criteria, thereby allowing persons named as authors to take public responsibility for the content of the paper.

1. Conceived and planned the work that led to the paper or interpreted the evidence it presents, or both.
2. Wrote the paper, or reviewed successive versions and took part in the revision process.
3. Approved the final version.

Holding positions of administrative leadership, contributing patients, and collecting and assembling data, however important to the research, are not, by themselves, criteria for authorship. Other persons who have made substantial, direct contributions to the work but cannot

be considered authors should be acknowledged with their permission; description of their specific contributions is encouraged.

With the cover letter include the statement on authorship criteria and responsibility that must be read by all authors and signed by at least one of the authors.

**Copyright.** Most of the provisions of the United States Copyright Act of 1976 became effective on Jan. 1, 1978. Therefore, **all manuscripts must be accompanied by the following written statement, signed by the authors:**

*"The undersigned author(s) transfer all copyright ownership of the manuscript (title of article) to the Brazilian Journal of Medical and Biological Research, in the event the work is published. The undersigned warrant(s) that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, and has not been previously published. The author(s) confirm that they have reviewed and approved the final version of the manuscript."*

All published manuscripts become the permanent property of the *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* and may not be published without written permission from the *Brazilian Journal*.

**Permission for Reproduction.** The journal has been registered with the Copyright Clearance Center, Inc., 222 Rosewood Dr., Danvers, MA 01923. Consent is given for the copying of articles for personal or internal use of specific clients. This consent is given on the condition that the copier pays directly to the Center the per copy fee beyond that permitted by US Copyright Law. This consent does not extend to other kinds of copyright, such as for general distribution, resale, advertising, and promotional purposes, or for the creation of new collective works.

All other inquiries regarding copyrighted material from this publication, other than those that can be handled through the Copyright Clearance Center, should be directed, in writing to Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Fax: +55-16-633-3825. E-mail: [bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br)

To request permission, please send us a request via e-mail, via fax or mail with the following information:

- Your name, title, and institution
- Your complete mailing address, phone number, fax number and e-mail
- Year of publication, volume number, and issue date
- Article title
- Authors' names
- Page numbers on which the material appears
- Specific figure number or portion of text (or supply a photocopy)
- Include the following information about your intended use:
  - Title of book/journal in which Brazilian Journal material will appear
  - Author(s)/editor(s)
  - Publishing company

---

## **Editorial Review and Processing**

Manuscripts received are acknowledged immediately. Once a paper has been evaluated, the authors will be notified of the editorial decision.

Accepted manuscripts are copyedited and proofs will be sent to authors for the correction of printer's errors. Authors are responsible for all statements made in their work, including changes made by the copy editor and authorized by the corresponding author.

The dates of receipt and acceptance will be published. If the paper is sent to the authors for revision and not returned within 6 months, the date of receipt will be revised. The date of acceptance will be assigned when the authors return the manuscript after the final correction for English style and clarity.

---

## **Manuscript Preparation**

Manuscripts should be submitted in English. Authors are requested to use American rather than British spelling, except, of course, for references whose titles should appear exactly as published. Guidance on grammar, punctuation, and scientific writing can be found in the following sources: *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*. 6th edn. New York: Cambridge University Press; 1994. *Medical Style and Format*. Huth EJ. Philadelphia: ISI Press; 1987. Marketed by Williams & Wilkins, Baltimore, MD. The *Brazilian Journal* manuscript requirements largely conform to the Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals, developed by the International Committee of Medical Journal Editors, Ann. Intern Medicine 1997, 126: 36-47.

**Text Format.** We can only accept the text of your manuscript as a Microsoft Word file created with MS Word 6.5 or a later version.

- **Submit the manuscript by e-mail**, in letter size (8.5 x 11"), with wide margins of at least 1 inch (2.54 cm), 23 lines per page, which contains approximately 2,156 characters, including spaces.
- Use a serif font, preferably **Times New Roman, 12 point** type and **double-space** throughout, including title page, abstract, text, acknowledgments, references, figure legends, and tables. Each page should contain the page number in the upper right corner starting with the title page as page 1.
- Express all measurements in Système International (SI) and standard units where applicable.
- Do not use abbreviations in the title or abstract and limit their use in the text.
- The length of the manuscript and the number of tables and figures should be kept to a minimum.
- Ensure that all references are cited in the text.

- Generic names must be used for all drugs. Instruments may be referred to by proprietary name; the name and location (state, city and country) of the manufacturer must be given in parentheses in the text.
- A file with good quality black-and-white figures could be supplied. Please send a .tif or .jpg file with 300 dpi resolution. We recommend Photoshop to prepare your figure file. More information in Figure Instructions.
- Color Figures. The *Brazilian Journal* normally publishes figures in black and white. However, color figures are published when absolutely necessary. The author must pay for the cost, which is US\$250.00 per plate. The author **must decide** about the use of color before submitting the paper since the reviewers will have to evaluate the paper in the form in which it will be published, if accepted.

**Related Publications.** All submissions must be accompanied by a list of the author's manuscripts on related subjects that are in press or currently under editorial review. A list of related published papers by the authors may also be helpful to the reviewers.

**Cover Letter.** A manuscript submitted for publication should be accompanied by a cover letter containing the following information.

- Full name(s) of author(s).
- Complete mailing address, including zip code, telephone number, Fax number and E-mail of corresponding author.
- Main subject area of the paper.
- A statement indicating if the paper is intended to be a full paper, short communication or review article.
- If the authors so wish, the names of five persons who could act as referees.
- If a version of the manuscript has been previously submitted for publication to the *Brazilian Journal* or to another journal, include comments from the peer reviewers and an indication of how the authors have responded to these comments.
- When appropriate, papers in the area of Clinical Investigation should include a statement indicating that the protocol has been approved by the Hospital Ethics Committee (Hospital with which at least one of the authors is associated).
- Provide permission for the reproduction of figures and tables from other sources.

Note: *Neither the manuscript nor the figures are returned to the authors.*

**Title page.** The title page should contain the following elements:

- Title should be as short and informative as possible, should not contain non-standard acronyms or abbreviations, and should not exceed two printed lines.
- Initials and last name(s) of author(s) (matched with superscript numbers identifying institutions).
- Institution(s) (Department, Faculty, University) of each author (in Portuguese if authors

are from Brazil). Acknowledgment of research grants and fellowships (agency and grant number).

- Name, complete mailing address, including zip code, telephone number, Fax number and E-mail of author to whom correspondence and requests for reprints should be sent.
- **Running title.** This short title to be used as a page heading should not exceed 60 letters and spaces.

**Key words.** A list of key words or indexing terms (no more than 6) should be included. The Journal recommends the use of medical subject headings of Index Medicus for key words to avoid the use of several synonyms as entry terms in the index for different papers on the same subject. Remember, key words are used by the Scielo Database (see <http://www.scielo.br/bjmb/articles search/subject>) to index your article.

### **Abstract**

- Since abstracts are published separately by Information Services, they **should contain** sufficient hard data to be appreciated by the reader, who may not have access to the full paper.
- The abstract should briefly and clearly present the problem, experimental approach, new results as quantitative data, and conclusions.
- The abstract should not exceed 250 words and should be written in a single paragraph **double-spaced** on a separate page following the title page.
- Undefined abbreviations may not be used.
- If the use of a reference is unavoidable, the full citation should be given within the abstract.
- Note that the *Brazilian Journal* publishes **unstructured abstracts**.

---

### **Writing a Good Abstract**

- Since most indexing services provide abstracts free of charge, the abstract is especially important because it is generally the first contact a potential reader has with your paper.
- Our objective, as Editors, is to provide the reader with an abstract that contains an accurate description of the content of the paper and which stimulates the reader to go to Scielo to read and/or obtain a copy of the paper. Hopefully, the reader will quote your paper and the Journal as well. The problem is that the abstract cannot have more than 250 words and thus each word must be weighed carefully.
- In one paragraph without subheadings, references or undefined abbreviations the abstract should contain:
  1. a statement of justification and the objective(s) of the research
  2. a description of the most important method(s) used
  3. identification of the experimental species studied: age, weight,

sex if relevant, and the number of subjects in each experimental group

4. report of the most important statistically significant new results (not all results), preferably in numerical form reporting both control and experimental values
5. a closing statement with a conclusion which is not simply a restatement of the results

- These suggestions are meant to provide an accurate statement of the content of your paper. It will stimulate serious scientists to read the paper. Please don't worry about giving away your results - ethical scientists will give you credit for your work.
- These suggestions should be useful for most of the papers published in the Brazilian Journal.
- We suggest you study the content of abstracts in the Journal and/or leading international journals to see how others have approached the problem of writing a good abstract.

**Footnotes.** Text footnotes, if unavoidable, should be numbered consecutively in superscript in the manuscript and written on a separate page following the abstract.

### **Headings in Text**

- Use only three levels of headings in the text. Clearly indicate the levels of headings by using the following typographic conventions.
- Position all headings flush with the left margin.
- First-level headings: **Initial capital letters, bold type.**
- Second-level headings: Initial capital letters, regular type.
- Third-level headings: *Initial capital letters, italic type.*
- Keep headings short (three or four words); do not use abbreviations.

### **Abbreviations and Symbols**

- Explain all abbreviations in the figure and table legends.
- Do not explain abbreviations for units of measurement [3 ml, not 3 milliliters (ml)] or standard scientific symbols [Na, not sodium (Na)].
- Abbreviate long names of chemical substances and terms for therapeutic combinations, such as MOPP. Abbreviate names of tests and procedures that are better known by their abbreviations than by the full name (VDRL test, SMA-12).
- Abbreviate units of measurement when they appear with numerals (measured in milliliters, but 10 ml). Use abbreviations in figures and tables to save space.

**Units.** The Système International (SI) of metric units is used for units and abbreviations of units.

Examples:

- s for second
- min for minute
- h for hour
- l for liter
- m for meter
- kDa for kilodaltons
- 5 mM rather than  $5 \times 10^{-3}$  M or 0.005 M

**Introduction.** This should state the purpose of the investigation, relationship to other work in the field, and reasons for undertaking the research. An extensive listing or review of the literature is not recommended.

**Material and Methods.** Sufficient information should be provided in the text or by referring to papers in generally available journals to permit the work to be repeated.

**Results.** The results should be presented clearly and concisely. Tables and figures should be used only when necessary for effective comprehension of the data. In some situations it may be desirable to combine Results and Discussion in a single section.

**Discussion.** The purpose of the Discussion is to interpret the results and relate them to existing knowledge. Information given elsewhere in the text may be cited but not repeated in detail in the Discussion.

**Acknowledgments.** If appropriate, briefly acknowledge technical assistance, advice and assistance from colleagues, etc. Financial support for the research and fellowships should be acknowledged on the title page.

---

## **Tables**

- Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and grouped together after the Reference section.
- All tables must be cited in the text in numerical order.
- Each table should be typed double-spaced on a separate page (or, if exceptionally large or requiring special symbols or unusual treatment, the table should be submitted as an image as .tif or .jpg file).
- A descriptive title and legend, in the form as they appear in the Journal, should make tables understandable without reference to the text (see a recent issue of the Journal).
- Explain all abbreviations in table legends.
- Vertical and diagonal rules should not be used in tables; instead, indentation and vertical or horizontal space should be used to group data.

---

## **Figures**

**Legends.** Type all figure legends double-spaced consecutively on a separate page. Begin each legend with a short title. Explain all abbreviations and symbols in the figure, even if they are explained in the text. Number the figures in the order in which they are cited in the text using consecutive Arabic numerals.

**Figures.** Figures should be professionally drawn or prepared using a computer and high-resolution printer and should be no larger than 8.5" × 11". We recommend the authors send electronic figures. See below.

**Photomicrographs** should include **stain and magnification data** at the end of the legend for each part of the figure. A magnification bar should be added to each photomicrograph. If no scale marker appears in the figure, the original magnification should be reported in the legend.

For color figures, submit ONE glossy print for the Journal. Color figures may be submitted and will be published in color IF ESSENTIAL. **The author must pay for the cost, which is US\$ 250.00 per plate. The author must decide about the use of color before submitting the paper since the reviewers will have to evaluate the paper in the form in which it will be published, if accepted.**

Indicate the name of the first author of the paper, the figure number, and the top of the figure on a label on the back of the figure. Words in figures should have an initial capital letter followed by lower-case lettering; letter size and type should be uniform in style.

Check figures carefully before submission to ensure that proper versions are being sent and that there are no labeling errors.

**Adapting/Reproducing Tables and Figures and Relevant Permissions.** Acknowledgments to original sources of fitted material should use the wording specified by the original publisher of the material. If no wording is specified, cite the authors, reference number, and the publisher. Letters of permission from the copyright holder must accompany submission of cited material.

## **Electronic Figures**

- All images should be at least 5 inches wide.
- Images should be provided in .tif or .jpg format as an attachment by E-mail, on CD or floppy disk For grayscale and color photographs, also submit a glossy copy by mail.
- For important information on the preparation of graphics in .tif or .jpg formats, go to <http://cjs.cadmus.com/da/>
- Only PC format is acceptable.
- Images should preferentially be prepared with Adobe Photoshop. In case a graphic was created with Microsoft Word or Excel, it should be saved in the original file format. **Do not copy/paste** graphics from one program to the other.
- Some application programs cannot be accepted, such as Microsoft Office (Access), Corel



Perfect Office (WordPerfect, Quattro Pro, Presentations), Lotus SmartSuite (Freelance Graphics, 1-2-3, Approach, WordPro), Harvard Graphics and SigmaPlot because they are not intended for the high resolution imaging necessary for publication. Graphics created in one of these programs and saved as .jpg or similar also cannot be accepted.

- Color images need to be CMYK, at least 300 dpi, and have an accompanying color photograph - not a color laser print or color photocopy. Note: This photograph will be used at press for color reproduction.
- Grayscale images should be at least 300 dpi and include a photograph.
- Line art (black and white or color) should be at least 300 dpi.
- Please include hardware and software information on the disk in addition to file names, and first author's name. Do not insert figures within the text.

---

## References

References should be typed double-spaced in **numerical** order on a separate sheet. Number references in the order in which they are first cited in the text, using arabic numerals in parentheses. Two or more references should be divided by a comma without a space (1,5,7), three or more consecutive references should be separated by a hyphen (4-9).

The following information must be given in the citation:

- last name and initials of all authors (**without punctuation**)
- year of publication
- title of article
- **complete name** of Journal (no abbreviations) in italics
- volume and pages
- if reference is a book, also give names and initials of editors, publisher and city.

Cite symposium papers only from published proceedings.

When citing an article or book accepted for publication but not yet published, include the title of the journal (or name of the publisher) and the year of expected publication.

**References to unpublished material**, i.e., papers presented orally at a meeting or unpublished work (personal communications, papers in preparation) **should be included in the text**, not in the references. A letter of permission from the cited persons to cite such communications should be annexed. **Submitted papers are considered unpublished material** and do not appear in the Reference list.

Provide complete data for each reference including an "available from" note for documents that may not be readily accessible.

Ensure that URLs used as references are active and available (the date on which the author accessed the URL should be included in the reference). For an example, see Citations of Electronic References, below.

*Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation.*

### **Examples:**

#### **Standard article (list up to 10 authors; if more than 10, add et al. after the 3rd author's name)**

Berridge MJ (1987). Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annual Review of Biochemistry*, 56: 159-193.

Evans BA & Richards RI (1985). Genes for the  $\alpha$  and  $\gamma$  subunits of mouse nerve growth factor are contiguous. *EMBO Journal*, 4: 133-138.

Evans BA, Drinkwater CC & Richards RI (1987). Mouse glandular kallikreins: structure and partial analysis of the kallikrein gene locus. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 8027-8034.

#### **Corporate author**

The Cardiac Society of Australia and New Zealand (1996). Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Medical Journal of Australia*, 164: 282-284.

#### **Supplement**

Nolly HL, Carretero OA, Lama MC, Miatello RM & Scicli AG (1994). Vascular kallikrein in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension*, 23 (Suppl I): I-185-I-188.

#### **Abstracts**

Enzensberger W & Fischer PA (1996). Metronome in Parkinson's disease. *Lancet*, 347: 1337 (Abstract).

#### **Books: List all authors or editors**

##### **Author**

Snedecor GW & Cochran WG (1980). *Statistical Methods*. 7th edn. Iowa State University Press, Ames, IA.

##### **Editors**

Norman IJ & Redfern SJ (Editors) (1996). *Mental Health Care for Elderly People*. Churchill Livingstone, New York, 455-468.

#### **Chapter in a book**

Scicli AG, Farthy R, Scicli G & Nolly HL (1992). The kallikrein-kinin system in heart and vascular tissue. In: Bonner G (Editor), *The Role of Bradykinin in the Cardiovascular Action of the Converting Enzyme Inhibitor Ramipril*. Hoechst, Frankfurt.

#### **Published proceedings paper**

More J (1999). Characterization and formulation development of a new liquid intravenous immunoglobulin. Bio Products Laboratory, Elstree, Herts, UK. *Plasma Product Biotechnology Meeting 1999*, Daydream Island, Queensland, Australia, March 27-30.

### **Thesis**

Gontijo B (1998). A reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. Doctoral thesis, Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

### **Other Citations in Reference List:**

**In press (must have journal title).** Papers accepted for publication may be cited in the Reference section. The citation should be complete and should end with: (in press).

Sumiyoshi H, Tignor GH & Shope RE (1996). Characterization of a highly attenuated Japanese encephalitis virus generated from molecularly cloned cDNA. *Journal of Infectious Diseases* (in press).

### **In-Text Citations of Unpublished Material (to be placed within parentheses):**

#### **Personal communication and unpublished papers**

Reference to "unpublished results" and "submitted papers" should appear in the text in parentheses following the individual name(s) and initials.

Example: (Santos CS, da-Silva GB and Martins LT, unpublished results). It is assumed that the author has obtained permission from the source when "personal communication".

### **Citations of Electronic References:**

- **Online journals with volume and page information**

Simon JA & Hudes ES (1999). Relationship of ascorbic acid to blood lead levels. *JAMA* (serial online), 281: 2289-2293. Available from: American Medical Association, Chicago, IL. Accessed August 24, 1999.

- **Online journals without volume and page information**

Gordon GF (1999). Bypassing heart surgery. *Alternative Medicine* (serial online), July, issue 30.

- **Online website**

Terre Haute Center for Medical Education. The THCME Medical Biochemistry page. [<http://www.indistate.edu/thcme/mwking/home.html>]. Accessed August 24, 1999.

---

## Manuscript Checklist

### General

- ( ) Submit by E-mail a file containing the manuscript that conforms to the format described in "Instructions for Authors".
- ( ) All listed authors have seen and approved the manuscript.
- ( ) List of all "in press" manuscripts cited accompany the submission.
- ( ) Contents of the manuscript have not been previously published and are not currently submitted elsewhere.
- ( ) Permission for the reproduction of figures and tables from other sources.
- ( ) An abstract that conforms with the required abstract format.
- ( ) Check all references for accuracy and completeness. Put references in proper format in numerical order, making sure each is cited in sequence in the text.
- ( ) When appropriate, papers in the area of Clinical Investigation should include a statement indicating that the protocol has been approved by the Hospital Ethics Committee (Hospital with which at least one of the authors is associated). Animal studies should be carried out according to ethical guidelines.
- ( ) Include a title for each table and figure - a brief, succinct phrase, preferably no longer than 10 to 15 words.
- ( ) Send a file with good quality black-and-white figures. For photographic material (for example, photomicrographs, radiographs, etc.), submit a glossy copy by mail. All photomicrographs carry scale bars.
- ( ) Color Figures. The *Brazilian Journal* normally publishes figures in black and white. However, color figures are published when absolutely necessary. The author must pay for the cost, which is US\$250.00 per plate. The author **must decide** about the use of color before submitting the paper since the reviewers will have to evaluate the paper in the form in which it will be published, if accepted.

### Cover Letter

- ( ) Include a statement signed by the corresponding author that written permission has been obtained from all persons named in the acknowledgements.
- ( ) Include full name(s) of author(s) for indexing.
- ( ) Complete mailing address, including zip code, telephone number, Fax number and E-mail of corresponding author.
- ( ) Main subject area of the paper.
- ( ) A statement indicating if the paper is intended to be a full-length paper, short communication, review article, overview or concepts and comments.
- ( ) If the authors so wish, the names of five persons who could act as referees.
- ( ) If a version of the manuscript has previously been submitted for publication to the *Brazilian Journal* or to another journal, include comments from the peer reviewers and an indication of how the authors have responded to these comments.

## **Title Page**

- ( ) Provide a title as short and informative as possible. It should not contain non-standard acronyms or abbreviations and should not exceed two printed lines.
- ( ) Initials and last name(s) of author(s) (matched with superscript numbers identifying institutions).
- ( ) Institution(s) (Department, Faculty, University) of each author.
- ( ) Acknowledgment of research grants and fellowships (agency and grant number).
- ( ) Name, complete mailing address, including zip code, telephone number, Fax number and E-mail of author to whom correspondence and requests for reprints should be sent.
- ( ) Running title.
- ( ) Key words.

*E-Mail a complete copy of the manuscript to: [bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br)*

**Brazilian Journal of Medical and Biological Research**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**  
**Av. Bandeirantes, 3900**  
**14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil**

### **Telephone and Fax**

**Brazil: (0XX) 16-633-3825**  
**Others: 55-16-633-3825**

**COMUNICAÇÃO INTERNA**

Data: 29/10/01

Nº: 125/01

De:	CEP	Para:	DRA.ROSICREUZA MARBACK DE SOUZA
C/c:			
Ref.:	PROJETO DE PESQUISA Nº15/01		

**Ilma. Sra.**  
**Dra.Rosicreuzza Marback de Souza**  
**M.D. Pesquisadora Principal do Projeto de Pesquisa nº 15/01**

Prezada Senhora :

Informamos a V.Sª que por sugestão da Dra.Liliana Ronzoni, este CEP acatou, como forma de incentivo, o patrocínio pelo Hospital São Rafael ao Projeto de Pesquisa nº 15/01, intitulado "Sobrecarga de ferro no tecido hepático de pacientes com infecção crônica pelo vírus C da hepatite".

Diante do exposto, o referido Projeto está aprovado para ser iniciado, ficando as despesas descritas no custeio, sob a responsabilidade do referido Hospital.

Atenciosamente,

Profa.Dra.Eliane Azevêdo  
Coordenadora do CEP