EVANDRO ANTONIO BENTES DE OLIVEIRA JUNIOR

**Alpha Glutathione S Transferase: marcador de lesão
hepática em pacientes com hepatite pelo vírus C?**

Tese apresentada ao Departamento de
Patologia da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Patologia
Orientador: Dr. Marcelo Nascimento Burattini

SÃO PAULO

2004

ICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira Junior, Evandro Antonio Bentes de

Alpha Glutathione S Transferase : marcador de lesão hepática em pacientes com hepatite pelo vírus C? / Evandro Antonio Bentes de Oliveira Junior. -- São Paulo, 2004.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Marcelo Nascimento Burattini.

Descritores: 1.GLUTATHIONE TRANSFERASE/análise 2. HEPATITE C/
patologia 3. ELISA/métodos

USP/FM/SBD-365/04

Dedico este trabalho a Deus pai e todo poderoso por permitir e me auxiliar para superar as adversidades e coroar uma vida dedicada aos estudos com a realização deste sonho.

Ao meu filho querido e amado Evandro Neto, mostrou que minhas conquistas até seu nascimento foram apenas etapas para atingir a mais importante de minha existência, a geração de uma nova vida.

Aos meus pais que com seus exemplos, confiança, apoio e amor sempre estiveram ao meu lado.

À minha esposa maravilhosa que sempre está presente com carinho e compreensão em todos os momentos.

As minhas irmãs lutadoras e vencedoras.

Aos meus tios e tias mostrando que nossa maior força é a união de nossa família.

Aos meus cunhados que têm demonstrado grande amizade e amor a nossa família.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcelo Nascimento Burattini meu orientador, pela sua paciência e auxílio incondicionais em todos os momentos. Poderia chamá-lo de professor, chefe ou doutor. Mas o que me apraz é poder chamá-lo de meu amigo, muito obrigado.

À Dra. Elizabeth Mendes pelos conselhos e orientações que me abriram portas para conquistas outrora apenas idealizadas. Obrigado pela confiança e amizade em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Antônio Alcir Barone pelo auxílio e amizade em todos momentos e pelo exemplo de simplicidade aliado ao domínio do conhecimento. Aos colaboradores Norma e Biazon do Lim 47-Laboratório de Investigação Médica em Hepatites do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, pela acolhida e auxílio na realização deste trabalho.

A Prof. Dra. Renata Perez pelas orientações e paciência nos momentos mais difíceis, seu auxílio foi fundamental para a realização deste sonho.

Ao Dr. Nairo e toda a equipe de colaboradores do Setor de Bioquímica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas – FMUSP, pelos exames realizados.

Ao Dr. Cristóvam e todos os colaboradores do Setor de Imunologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas – FMUSP pela acolhida e realização deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Adagmar Andriollo e a Profa. Dra. Maria Lúcia Gomes Ferraz que acreditaram em mim, quando eu era apenas mais um médico vindo do norte para estudar.

Ao Prof Dr. Raymundo Soares de Azevedo Neto, coordenador da pós-graduação do Departamento de Patologia da FMUSP, pelo auxílio e compreensão nos momentos difíceis.

Às secretárias Liduvina Barros e Vera Noya, pela ajuda constante.

Ao Prof. Alex, pelo auxílio indispensável e incondicional na análise estatística.

Aos pacientes e doadores de sangue que contribuíram, para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

INTRODUÇÃO	1
1.1 O vírus da Hepatite C	6
1.2 Epidemiologia	12
1.2.1 Vias de transmissão	14
1.3 História Natural da Hepatite pelo HCV	18
1.4 Diagnóstico Laboratorial	22
1.4.1 Testes bioquímicos	23
1.4.2 Testes Sorológicos	24
1.4.3 Ensaio imunoenzimático – EIE	25
1.4.4 Ensaio do tipo <i>imunoblot</i>	27
1.4.5 Testes para detecção do antígeno do core do HCV	27
1.4.6 Testes Moleculares	28
1.4.6.1 Pesquisa do HCV – RNA – teste qualitativo	28
1.4.6.2 Pesquisa do HCV – RNA - teste quantitativo	30
1.4.6.3 Genotipagem	30
1.5 Diagnóstico Histopatológico	31
1.5.1 Biópsia Hepática	31
1.6 Imunopatogênese da Infecção pelo HCV	34
1.6.1 Componentes da Resposta Imune Antiviral	35
1.6.1.1 Resposta Imune Inespecífica	36
1.6.1.2 Resposta Imune Específica	36
1.6.2 Resposta Imune Celular	37
1.6.3 Resposta Imune na Infecção pelo HCV	40
1.6.3.1 Resposta Imune Humoral	41
1.6.3.2 Resposta Imunológica Celular	43
1.6.4 Mecanismo de Persistência Viral na Hepatite pelo HCV	51
1.7 Alpha glutathione S transferase	54
OBJETIVOS	59

CASUÍSTICA E MÉTODOS	61
3.1 Desenho do Estudo	62
3.2 Casuística	62
3.2.1 Critérios de inclusão no grupo	63
3.2.2 Critérios de exclusão no grupo	63
3.3 Método	64
3.3.1 Caracterização da Infecção pelo vírus C	64
3.3.2 Variáveis Analisadas	64
3.3.2.1 Epidemiológicas	64
3.3.2.2 Laboratoriais	64
3.3.4 Histológicas	67
3.4 Análise da α -Glutathione-S-Transferase	70
3.4.1 Descrição do método	71
3.5 Análise estatística	73
RESULTADO	74
4.1 Análise descritiva	75
4.1.1 Características gerais da amostra	75
4.1.2 Avaliação Bioquímica	76
4.1.3 Avaliação Histológica	77
4.1.4 Determinação do valor de corte normal da α GST	79
4.1.5 Resultados da α GST nos grupos doente e normal	79
4.1.6 Determinação da concentração de α GST indicadora de lesão hepática	80
4.1.7 Análise das enzimas hepáticas (α GST, ALT, AST e γ GT) em relação à histologia hepática	81
DISCUSSÃO	83
CONCLUSÕES	90
ANEXOS	92
Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido	93
Anexo B - Características gerais dos pacientes	97
REFERÊNCIAS	99

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
bDNA	DNA ramificado
Bx	biópsia
CD4	linfócitos T auxiliares
CD8	linfócitos T supressores
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
DO	densidade óptica
DLC	Divisão de Laboratório Central
DNA	ácido desoxirribonucleico
E1	proteína estrutural 1
E2	proteína estrutural 2
ELISA	enzima imuno-ensaio
Eq/ml	equivalentes por mililitro
γGT	gama glutamil transferase
HCV	vírus da hepatite C
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HNANB	Hepatite não A, não B
HVR1	região hipervariável 1
HVR2	região hipervariável 2

IFN	interferon
INNO-LIA	line immunoassay
INNO-LIPA	line probe assay
ISDR	região determinante de sensibilidade ao interferon
L	lobular
LIM	Laboratórios de Investigação Médica
Log	logaritmo de base 10
N	número de pacientes
NS2	proteína não estrutural 2
NS3	proteína não estrutural 3
NS4	proteína não estrutural 4
NS5	proteína não estrutural 5
NASBA	nucleic acid sequence basead assay
ORF	fase de leitura aberta
PCR	reação da cadeia em polimerase
PKR	proteína quinase RNA dependente
RNA	ácido ribonucléico
TH1	linfócitos T helper 1
TH2	linfócitos T helper 2
TNF	fator de necrose tumoral
µg	micrograma
UI/L	Unidades Internacionais/litro
VHC	vírus da hepatite C
XLSN	número de vezes o limite superior da normalidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura genômica do vírus da hepatite C	9
Figura 2: Sensibilidade e especificidade da α GST na determinação do valor normal para o teste.....	79
Figura 3: Sensibilidade e especificidade da α GST na determinação de lesão histológica hepática mais agressiva	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características gerais da amostra.....	76
Tabela 2: Valores de média e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos observados (N=114).....	76
Tabela 3: Distribuição das alterações histológicas.....	78
Tabela 4: Resultados da α GST nos grupos de pacientes e controle.....	80
Tabela 5: Análise comparativa das variáveis analisadas na biópsia hepática com as enzimas.....	82

RESUMO

Oliveira-Jr EAB. *Alpha Glutathione S Transferase: Marcador de Lesão Hepática em Pacientes com Hepatite pelo Vírus C?* [tese]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004. 135p.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS: A α -Glutathione-S-transferase (α GST) vem sendo proposta como um marcador sensível e não-invasivo de lesão hepática em pacientes com Hepatite pelo vírus C. Avaliamos neste trabalho como a (α GST) se correlaciona com características bioquímicas e histológicas em pacientes com HCV. **MATERIAL E MÉTODOS:** Realizamos a determinação da concentração plasmática das α GST, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamyl-transferase (γ GT) em 114 pacientes com HCV, dos quais 97 foram submetidos à biópsia hepática em até 6 meses da realização dos testes bioquímicos. Avaliamos também os níveis de α GST em 66 doadores de sangue sadios, que serviram como controles. Comparamos os níveis de α GST com as demais provas bioquímicas e a histologia hepática. **RESULTADOS:** A α GST estava elevada em 85.96% dos pacientes com HCV e mostrou associação com a elevação das aminotransferases ($p < 0.01$). O valor de $4\mu\text{g/dL}$ mostrou as melhores sensibilidade (85,96%) e especificidade (92,42%) para determinar a normalidade do teste α GST. α GST $\geq 8\mu\text{g/dL}$ mostrou a melhor especificidade para determinar lesão histológica hepática mais agressiva e o melhor valor preditivo positivo e razão de verossimilhança positiva para inflamação portal e atividade parenquimatosa mais agressiva nos pacientes com HCV. **CONCLUSÕES:** A α GST está relacionada à lesão hepática na infecção pelo HCV (valor de corte = $4\mu\text{g/dL}$) e lesões histológicas hepáticas mais agressivas (valor de corte = $8\mu\text{g/dL}$). Neste contexto, a α GST poderia ser utilizada em pacientes com Hepatite pelo HCV com ALT elevada, como um indicador complementar de lesão histopatológica mais agressiva. Entretanto, seu valor preditivo positivo não é suficientemente elevado para evitar a necessidade de realizar a biópsia hepática, mesmo quando está acima de $8\mu\text{g/dL}$.

Descritores: 1.GLUTATHIONE TRANSFERASE/análise 2.HEPATITE C/ patologia 3.ELISA/métodos

SUMMARY

Oliveira-Jr EAB. *Alpha Glutathione S Transferase: A Marker of Liver Damage in Hepatitis C Virus Patients?* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2004. 135p.

BACKGROUND/AIMS: α -Glutathione-S-transferase (α GST) has been proposed as a sensitive non-invasive indicator of hepatocellular injury due to Hepatitis C virus (HCV) infection. In this work, we evaluate how alpha-GST concentration correlates with biochemical and histological features in HCV patients. **METHODS:** We assayed plasma α GST, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and gama-glutamyl-transferase (γ GT) in 114 HCV⁺ patients, among whom liver biopsy was performed in 97, within 6 months of the biochemical evaluation. We also assessed α GST levels in 66 health blood donors, aimed to serve as control. We compared α GST levels with other biochemical tests and liver histology. **RESULTS:** In 85.96% of HCV patients α GST was elevated and showed association with serum aminotransferases ($p < 0.01$). The value of 4 μ g/dL (or lower) showed the best sensitivity (85.96%) and specificity (92.42%) to determine normality on the α GST test. α GST levels 8 μ g/dL and higher showed the best specificity to determine the presence of more aggressive liver histological damage among HCV patients and the best predictive positive value and positive likelihood for more aggressive portal inflammation and lobular activity. **CONCLUSION:** α GST is related to HCV infection (cut-off = 4 μ g/dL) and more aggressive liver histological damage (cut-off = 8 μ g/dL). In this sense, α GST could be used in HCV patients with altered ALT levels as an indicator of more aggressive hystopathological damage. However, its positive predictive value (PPV) is not high enough to preclude the decision of performing hepatic biopsy, even when it is above 8 μ g/dL.

Keywords: 1.GLUTATIONA TRANSFERASE/análise 2.HEPATITE C/ patologia 3.ELISA/métodos

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Em meados da década de 70, surgiu o termo hepatite não-A, não-B (HNANB), para designar as hepatites de provável etiologia viral, que não eram causadas pelos vírus das hepatites A ou B e permaneciam sem diagnóstico etiológico definido (Prince *et al.*, 1974).

Após a identificação do vírus da hepatite C (HCV) (Choo *et al.*, 1989), empregando-se técnicas de biologia molecular e, após a criação de um método sorológico para detecção do anticorpo contra o HCV (Kuo *et al.*, 1989), foi possível associar a maior parte das HNANB pós-transfusionais ao HCV (Alter, 1992), possibilitando que diversos estudos fossem realizados e comprovassem a imensa importância deste vírus (Alter *et al.*, 1999).

O HCV é um vírus de distribuição global. Estima-se que hoje, 3% da população mundial tenham infecção crônica pelo HCV, o que significa aproximadamente 300 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo. No Brasil, estima-se que há mais de um milhão de portadores crônicos do vírus C, de acordo com dados recentes da Sociedade Brasileira de Hepatologia, apresentando distribuição relativamente homogênea entre as diferentes regiões (Kamitsukasa *et al.*, 1989; Menitove *et al.*, 1990; Contreras *et al.*, 1991; Asfora *et al.*, 1992; Winckler *et al.*, 1992; Saez-Alquezar *et al.*, 1994; SBH, 1999; Ward *et al.*, 2002).

A aquisição da infecção pelo HCV ocorre mais eficientemente por exposição parenteral, como transfusão sanguínea, de hemoderivados,

transplante de tecido ou órgãos de pacientes infectados e o compartilhamento de agulha infectada por usuários de drogas ilícitas injetáveis (Alter *et al.*, 1994; Carrilho e Clemente *et al.*, 2003).

A transfusão de sangue, inicialmente importante forma de transmissão, tem se tornado cada vez mais raramente implicada, após a obrigatoriedade do uso de testes sorológicos para a detecção do anti-HCV nos bancos de sangue, no início da década de 90 (Alter *et al.*, 1995; Schreiber *et al.*, 1996). Atualmente, as principais formas de transmissão são o uso intravenoso de drogas de abuso e a exposição sexual (Carvalho *et al.*, 1996; Alter, 1997; Massad *et al.*, 1999).

O risco de transmissão por via sexual é controverso, o perinatal é baixo, estimado em 5%, (Akahane *et al.*, 1994; Alter *et al.*, 1994; Booth *et al.*, 1995; Dienstag, 1997; Marcellin *et al.*, 1999). A transmissão vertical pode chegar em alguns países como o Egito a 36% (Kassen *et al.*, 2000).

Outras formas relatadas de transmissão são acupuntura, *piercing*, tratamento dentário, tatuagem, hemodiálise e atividade profissional na área de saúde (Ko *et al.*, 1992; Alter *et al.*, 1994; Alter *et al.*, 1997). Em cerca de 40 a 60% dos casos, entretanto, não é possível identificar a forma de aquisição da infecção pelo HCV, o que caracteriza a forma esporádica da doença (Alter *et al.*, 1992; Shahara *et al.*, 1996).

Após a infecção pelo vírus da hepatite C, 50 a 80% dos pacientes cronificam. Destes, 20 a 40% eventualmente desenvolvem cirrose após 20 a 30 anos. O hepatocarcinoma pode emergir em 20% daqueles que evoluem para cirrose, após 30 anos de infecção (Alter *et al.*, 1994; Poynard *et al.*, 1997).

A mortalidade na infecção pelo HCV está principalmente relacionada à evolução para a cirrose (Tong *et al.*, 1995), sendo o grau de fibrose o fator prognóstico mais importante na evolução dos pacientes com infecção crônica pelo vírus C (Perrilo, 1997).

A dosagem da alanina-aminotransferase (ALT) é o principal marcador bioquímico de lesão hepática, porém, nem todos os pacientes com viremia apresentam elevação desta enzima (Alter *et al.*, 1992; Hoofnagle *et al.*, 1997). Cerca de 25% dos pacientes com hepatite crônica pelo HCV apresentam níveis persistentemente normais de ALT, sem correlação entre níveis normais desta enzima e histologia hepática (Puoti *et al.*, 1997; Marcellin *et al.*, 1999; Jacobson, 2000; Persico *et al.*, 2000).

A análise histológica da biópsia hepática auxilia na avaliação da gravidade da doença, na indicação do tratamento e no monitoramento da evolução da infecção crônica (Goodman e Ishak, 1995). Embora não possua característica histológica específica, a hepatite provocada pelo HCV possui três achados freqüentes: esteatose, agregados linfóides e lesão de ductos biliares (Scheuer *et al.*, 1992).

A presença de folículos linfóides no parênquima hepático, imunocomplexos circulantes, auto-anticorpos e crioglobulinemia sugerem mecanismo imunológico na patogenia do HCV (Pawlotsky *et al.*, 1995). Por outro lado, há evidências de que o HCV possa ter ação citopática direta nos hepatócitos. A redução dos níveis de glutatona no plasma e nas células mononucleares do sangue periférico, o aumento do ferro e malonaldeído e a presença de esteatose no parênquima hepático de pacientes com hepatite

crônica pelo HCV sugerem que reações oxidativas podem participar da lesão induzida por este vírus. Isto talvez ocorra pela ação citopática direta do HCV (Scheuer *et al.*, 1991; Suarez *et al.*, 1993; Arber *et al.*, 1994; Gerber *et al.*, 1995; Farinati *et al.*, 1995).

A alpha GST tem sido descrita como possível marcador de lesão hepática (Loguercio *et al.*, 1998; Boran e Çetin, 1999; Giannini *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000), entretanto outros autores não conseguiram resultados que confirmem estes achados (Thornburn *et al.*, 1996; Namour *et al.*, 1999).

É de extrema importância a identificação da doença em seu início, permitindo o acompanhamento apropriado, o que poderia alterar a evolução da mesma. Infelizmente não dispomos de testes laboratoriais de rotina, com sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança e valor preditivo suficientemente elevados para estadiar indiretamente a lesão histológica na hepatite pelo HCV, sendo imperativo, na maior parte das vezes, a realização da biópsia hepática. Contudo, por ser um procedimento invasivo, podem ocorrer complicações, especialmente em alguns pacientes, como os portadores de insuficiência renal crônica e coagulopatias. Além dos eventuais riscos, não pode ser repetido com a frequência que se deseja.

Como alternativa para a biópsia hepática, vêm sendo avaliados marcadores séricos indiretos de desarranjo estrutural hepático, que possibilitariam a análise com maior frequência e eficácia que os ensaios atualmente em uso, sem a necessidade de submeter o paciente ao risco do exame invasivo. Estes testes, entretanto, ainda não estão disponíveis na rotina laboratorial (Engström-Laurent *et al.*, 1985; Luo *et al.*, 2002).

1.1 O vírus da Hepatite C

Em 1989, pesquisadores da *Chiron Corporation* e do *Centers for Disease Control* (CDC) identificaram e clonaram o agente etiológico da hepatite não-A, não-B, denominando-o vírus da hepatite C (Choo *et al.*, 1989).

Foi inicialmente isolado um clone positivo (5-1-1), responsável pela codificação de um peptídeo imunogênico específico do HCV, que serviu de base para a elaboração de um peptídeo maior (c100-3), empregado como antígeno-alvo no desenvolvimento do primeiro teste sorológico imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos contra o HCV (Kuo *et al.*, 1989). Com a aplicação deste teste, foi possível associar a maior parte das HNANB pós-transfusionais ao HCV (Alter, 1992). O vírus C é hepatotrópico e, o único vírus conhecido do gênero *hepacivirus* que está classificado dentro da família *Flaviviridae*, a qual tem como membros também os gêneros *flavivirus* e *pestivirus* e os GB vírus (GBV-A, GBV-B, GBV-C/HGV) (Kato *et al.*, 1990; Purcell, 1997).

O HCV possui forma esférica, com 50nm de diâmetro e estrutura externa composta por um envelope glicoproteico (Shimizu *et al.*, 1996).

Seu genoma é constituído por RNA de fita simples, positivamente orientado, com 9,5 kb e nove mil quatrocentos e um nucleotídeos, organizados em uma fase de leitura aberta (*open reading frame* - ORF) (Choo *et al.*, 1989) (Figura 1). A tradução da ORF resulta na síntese de uma poliproteína que, sob ação de proteases, helicases virais e enzimas do

hospedeiro, dá origem às proteínas estruturais do vírus, as quais são as proteínas do envelope e componentes do nucleocapsídeo viral (core) e; não estruturais, relacionadas com a replicação e maturação viral (Kato *et al.*, 1990; Houghton *et al.*, 1991; Choo *et al.*, 1991). As proteínas estruturais: core (C), as duas glicoproteínas do envelope (gp33 e gp72) glicoproteína E1 (E1) e glicoproteína E2 (E2/P7) estão localizadas na extremidade carboxila, já as não-estruturais: NS2, NS3, NS4A/B e NS5A/B, estão localizadas na extremidade amino da poliproteína. Encontramos também regiões não-codificantes nas extremidades do genoma do vírus: região 5' UTR e 3' UTR.

A região terminal 5' possui de 329 a 341 nucleotídeos, é a mais conservada do genoma, estando relacionada à replicação viral e translocação das proteínas virais (Yoo *et al.*, 1992; Van Der Poel *et al.*, 1994). Sua importância nestes processos é aumentada pela grande semelhança em (85%) desta região entre os diferentes genótipos (Han *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1992; Van Doorn, 1994). Nesta região há um sítio interno de entrada ribossomal (*Internal ribosome-entry site*, IRES) que dá início à translação da proteína viral de forma independente ao *cap*. A ORF codifica uma poliproteína com 3010 a 3033 nucleotídeos (Kato *et al.*, 1990; Choo *et al.*, 1991), a qual posteriormente é clivada durante e após a tradução por peptidases de sinal celular e proteases virais, dando origem a proteínas funcionais, estruturais e não estruturais (Okamoto *et al.*, 1991). As proteínas NS2 e NS3 são proteases virais envolvidas no processamento das proteínas não estruturais. A proteína NS3 é uma helicase; a região NS4 codifica as proteínas p8 e p24, sem função conhecida (Van Doorn, 1994); a

proteína NS4A é um co-fator para a protease NS3 e a proteína NS4B tem função desconhecida. Há forte indicação de que a região NS5A medeia à resistência do HCV ao interferon (IFN) e regula a replicação viral (De Francesco 1999; He e Katze, 2002). Dependendo da sequência nucleotídica estudada nesta região a suscetibilidade ao INF difere no HCV. Há uma região descrita que seria determinante de sensibilidade ao INF (Interferon Sensitivity Determining Region, ISDR) no genótipo 1b, localizada na extremidade mais próxima à extremidade carboxila da região NS5A (Enomoto 1995; Enomoto 1996; Chayama 1997). Contudo, estudos mais recentes demonstraram outra região com capacidade de interagir com a proteína quinase RNA - dependente - PKR (proteína que medeia os efeitos antivirais do INF frente ao HCV). Esta região, localizada na proteína E2, denominada PePHD (*PKR - eIF2 α phosphorylation homology domain*), possui sequência homóloga à PKR e ao fator de alongamento da tradução (*eIF2 α*). Taylor et al., em 1999, demonstraram que sua sequência nucleotídica é variável de acordo com o padrão de sensibilidade ou resistência ao tratamento com IFN, sua importância estaria na predição da resposta sustentada ao IFN, não estabelecida totalmente, com resultados controversos obtidos por diferentes grupos (Sarrazin et al., 2000; Chayama et al., 2000; Berg et al., 2000; Gerotto et al., 2000; Murphy et al., 2002). A região NS5B, representando a RNA - polimerase viral dependente de RNA, está relacionada com a replicação viral (NIH, 2000). Foram descritas duas regiões de hipervariabilidade na região E2: HVR1 e HVR2 respectivamente, apresentando provável importância nos mecanismos de escape imune após

infecção aguda e em pacientes cronicamente infectados submetidos a tratamento (Alter, 1995; Houghton *et al.*, 1991; Okamoto *et al.*, 1992; Grakoui *et al.*, 1993).

A região 3'UTR possui três constituintes: uma região variável, pouco conservada entre os diferentes genótipos; uma região interna, rica em resíduos uracila (poli U); e uma região altamente conservada, também denominada cauda X. Acredita-se que a cauda X desempenhe papel primordial na replicação do HCV, uma vez que não ocorre replicação de isolados do vírus sem esta região no seu RNA (Yanagi *et al.*, 1999; Kolykhalov *et al.*, 2000).

Figura 1: Estrutura genômica do vírus da hepatite C

Estudando a cinética viral observou-se que à semelhança de outros vírus RNA, o HCV possui alta taxa de mutação, que ocorre durante a replicação viral (Simmonds, 1995), com ritmo de 1,44 a $1,92 \times 10^{-3}$ substituições de bases por sítio/ano (Ogata *et al.*, 1991).

O HCV apresenta uma grande heterogeneidade genética, que torna possível sua classificação em pelo menos 11 genótipos, que diferem entre si por apresentarem divergências em 30 a 35% na sequência de nucleotídeos, e 90 subtipos com 70 - 80% de identidade (Stuyver *et al.*, 1996). Além disto, há *quasispecies*, que apresentam mais de 98% de homologia na sequência de nucleotídeos.

Após rever todas as classificações, Simmonds *et al.*, em 1994, propuseram uma uniformização, que é a mais utilizada atualmente.

São seis os genótipos mais importantes, classificados em algarismos arábicos de 1 a 6, com 11 subtipos designados por letras minúsculas (a,b,c), ambos por ordem de descoberta (1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 3a, 3b, 4a, 5a e 6a) (Okamoto *et al.*, 1992; Simmonds *et al.*, 1993; Burck *et al.*, 1995). Há evidências sorológicas e filogenéticas que sugerem que os outros genótipos são, na realidade, subtipos do tipo 3 (genótipo 10) e 6 (genótipos 7,8,9 e 11) (Okamoto *et al.*, 1992; Simmonds *et al.*, 1993; Simmonds *et al.*, 1995; Bukh *et al.*, 1995).

A RNA polimerase RNA dependente, por ser deficiente em reconhecer erros de incorporação de nucleotídeos ocorridos durante a replicação, com ausência de atividade de revisão do produto de transcrição (*proof-reading*), resulta na produção de *quasispecies* em um mesmo paciente, isto é, mesmo

genótipo e subtipo com similaridade superior a 98 % da sequência nucleotídica coexistindo simultaneamente em um mesmo paciente.

Acredita-se que a formação de *quasispecies* seja um mecanismo de escape à pressão do sistema imune que facilita a perpetuação da infecção e dificulta o desenvolvimento do estado de imunidade, determinando a cronicidade da infecção, pois possibilita a seleção de mutantes que não são anulados pelos anticorpos neutralizantes ou citocinas dos linfócitos T (Farci *et al.*, 1992; Kato *et al.*, 1996; Purcel, 1997).

Os genótipos do HCV apresentam heterogeneidade na distribuição geográfica e possivelmente na patogênese, sendo questionado o papel dos diversos genótipos na resposta ao tratamento e na história natural da infecção (Pozzato *et al.*, 1994; Missale *et al.*, 1997). Os genótipos 1b e 4 parecem estar associados a pior resposta terapêutica (El-Zayadi *et al.*, 1995; Maertens e Stuyver, 1997). Os genótipos 1, 2 e 3 são encontrados em todo o mundo, sendo responsáveis pela maioria das infecções no Ocidente (Simmonds *et al.*, 1994; Maertens e Stuyver, 1997). Na América do Norte, o genótipo 1 é o mais prevalente, compreendendo 60%, seguido pelos genótipos 2 e 3 respectivamente. No Egito e na África Central, o genótipo 4 é predominante, enquanto o genótipo 5 é encontrado principalmente na África do Sul. Em Macau, Hong-Kong e Vietnã, o genótipo 6 é o mais prevalente (Mellor *et al.*, 1995; Purcell, 1997).

No Brasil, o genótipo 1, subtipo b, é o mais prevalente, exceto na região Sul do país onde ocorre maior prevalência do genótipo 3 (Krug *et al.*, 1996; Campiotto, 2002; Carrilho e Corrêa, 1998; Carrilho e Clemente, 2003).

1.2 Epidemiologia

O HCV é um vírus de distribuição global, com cerca de 300 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo. É um vírus com distribuição geográfica muito heterogênea. A prevalência da infecção entre doadores de sangue na Europa Ocidental varia de 0,5 a 1,2%; 0,9 a 1,3% no Oriente, sendo de 1,3% no Japão. Nos EUA, estima-se que haja quase 4 milhões de indivíduos infectados, compreendendo 1,8% de toda a população, com 8-10 mil óbitos/ano de doença hepática em decorrência da infecção por este vírus. (Kamitsukasa *et al.*, 1989; Menitove *et al.*, 1990; Contreras *et al.*, 1991; Asfora *et al.*, 1992; Wincker *et al.*, 1992; Takano *et al.*, 1995; Alter *et al.*, 1997; WHO, 1999; Wasley e Alter, 2000).

Após a realização de estudos epidemiológicos em doadores de sangue, observou-se que há áreas de alta, média, baixa e muito baixa prevalência.

Prevalência muito baixa foi encontrada no Reino Unido e na Escandinávia, com valores indicativos da presença do vírus da hepatite C inferiores a 0,1%. Níveis baixos foram encontrados na Europa Ocidental, América do Norte, algumas áreas da América do Sul e Central, em países africanos como África do Sul e na Austrália, com 0,2 a 0,5% de prevalência.

O Brasil, com mais de 1 milhão de portadores crônicos do vírus C, de acordo com dados da Sociedade Brasileira de Hepatologia, e distribuição homogênea entre as diferentes regiões é considerado de prevalência intermediária, exceto alguns estados classificados como de alta prevalência

(Acre, Pará e Rio de Janeiro) (Saez-Alquezar *et al.*, 1994; SBH, 1999). Trabalho realizado entre doadores de sangue do Rio de Janeiro constatou maior frequência de HCV em pacientes do sexo masculino, com risco de infecção aumentando com a idade, sendo maior no grupo de 40 a 49 anos (Carrilho e Clemente, 2003). Fazendo análise populacional do município de São Paulo, Focaccia *et al.*, estimaram em 1998, a prevalência da infecção pelo HCV em 1,4%. Há uma diversidade na frequência deste vírus de acordo com a idade do indivíduo, observando-se que o HCV é adquirido geralmente na idade adulta ao submeter-se a fatores de risco. Assim como o Brasil países do leste europeu, Oriente Médio, Índia e Ásia são considerados de prevalência intermediária, entre 1 a 5%. A Líbia com 7% e o Egito com 17 a 26% são os países com maior prevalência de infecção pelo vírus C no mundo (Wasley e Alter, 2000).

A avaliação da prevalência em várias faixas etárias permitiu a determinação de 3 grupos com características epidemiológicas distintas, reflexo da prevalência local do HCV e dos hábitos da população ao longo do tempo.

No primeiro grupo estão, EUA, Austrália e Brasil, com taxas de prevalência mais elevadas na 4^a e 5^a décadas de vida, correlacionando-se a contaminações ocorridas 10 a 30 anos antes do diagnóstico (Figueiredo, 1998; Wasley e Alter, 2000).

No Japão e Itália, encontram-se taxas de prevalência mais altas em idosos, com a contaminação tendo ocorrido há mais de 30 anos (Wasley e Alter, 2000).

No terceiro grupo, encontra-se o Egito com presença do HCV em todas as faixas etárias, com elevado risco passado e presente para contaminação (Wasley e Alter, 2000).

1.2.1 Vias de transmissão

A aquisição da infecção pelo HCV ocorre mais eficientemente por exposição parenteral, como transfusão sangüínea ou de hemoderivados, transplante de tecido ou órgãos de pacientes infectados e o compartilhamento de agulha infectada por usuários de drogas ilícitas injetáveis (Alter *et al.*, 1994).

A transfusão de sangue, inicialmente importante forma de transmissão, tem se tornado cada vez mais rara, após a obrigatoriedade do uso de testes sorológicos para a detecção do anti-HCV nos bancos de sangue, no início da década de 90. A incidência de hepatite pós-transfusional, nos EUA, caiu de 10% para 0,3 a 0,5 % após o início da utilização dos testes de triagem (Alter *et al.*, 1992); hoje, o risco de transmissão por unidade transfundida de sangue caiu para 0,01 a 0,001% (Alter *et al.*, 1995; Schreiber *et al.*, 1996). No Brasil, Coelho (1997) observou em politransfundidos, que a prevalência da infecção pelo vírus C diminuiu de 18 para 1,4% após 1992 com a utilização do teste para detecção do anti-HCV, declínio de 92,3%. Em outro estudo mais recente, observou-se que a frequência de infecção pós-transfusional pelo HCV em São Paulo, grupo de 1103 pacientes receptores de sangue, um em cada 515 apresentaram

sorologia positiva para HCV (ELISA II) no seguimento clínico-laboratorial semestral (Nukui *et al.*, 1998).

Apesar da falta de cuidados básicos, a transmissão associada a procedimentos médicos é incomum, exceto as que ocorrem em centros de hemodiálise, onde encontramos altas taxas de prevalência do HCV. O borriço de sangue na conjuntiva foi considerado via de transmissão em alguns casos (Sartori *et al.*, 1993; Ippolito *et al.*, 1998). A prevalência do HCV entre os profissionais da área de saúde é variável: nos Estados Unidos e Europa, países desenvolvidos, varia de 1 a 2%, no Brasil está em torno de 3% (Carrilho e Clemente, 2003).

Atualmente, as principais formas de transmissão são através do uso de drogas de abuso e exposição sexual (Alter, 1997).

Nos Estados Unidos, entre 1986 e 1988, 42% dos casos de hepatite aguda pelo HCV ocorreram entre os usuários de drogas endovenosas, sendo a prevalência mundial de 70 a 90% (Alter *et al.*, 1992). No Brasil, trabalhos mostraram frequência de HCV de 14 a 70% entre os usuários de drogas ilícitas endovenosas e, o Rio de Janeiro apresentou maior prevalência (69,6%) (Carrilho e Clemente, 2003).

O risco de transmissão por via sexual é controverso, segundo alguns autores é estimado em 5%, bem abaixo do risco de transmissão da hepatite B, e geralmente associado à prática sexual de risco, ao número de parceiros e à duração do relacionamento com parceiro infectado (Akahane *et al.*, 1994; Alter *et al.*, 1994; Booth *et al.*, 1995). A presença de co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) parece aumentar o risco de

transmissão sexual do HCV de 3 para 11% em parceiros hemofílicos (Eyster *et al.*, 1991). Há evidências de transmissão do vírus entre parceiros sexuais com dados expressivos de prevalência e similaridade genômica viral. Um estudo brasileiro recente demonstrou a frequência de 11,76% de HCV em parceiros sexuais de pacientes HCV-RNA positivos, sem outros fatores de risco para infecção pelo HCV que fossem estatisticamente significantes (Tengan *et al.*, 2001). Outro estudo recente realizado no HCFMUSP observou prevalência de 20,2% de casais HCV-RNA positivos, a partir de um dos cônjuges já sabidamente infectados pelo HCV. Foi encontrada concordância genotípica do HCV em 16 dos 20 casais estudados e, maior frequência do genótipo 1 (Carrilho e Clemente, 2003). Estes dados, entretanto, são insuficientes para provar a transmissão sexual do vírus, uma vez que não se pode afastar outros fatores de risco como, transmissão parenteral inaparente e/ou uso de drogas ilícitas endovenosas não admitidas (Quer *et al.*, 1998).

Contudo outros autores mostram dados contra a via sexual, como via de transmissão do HCV. Como no trabalho africano que comparou prostitutas com gestantes e demonstrou prevalência do HCV em 6,6 e 4,3% respectivamente (Laurent *et al.*, 2001).

A contaminação de parceiros sexuais fixos, estudada em casais de vários países, determinou que para a via sexual também há variação de prevalência associada à distribuição geográfica. Na Europa Ocidental e nos EUA, é baixa a prevalência entre indivíduos que mantêm contato sexual com portadores, taxa inferior a 1,3%. Por outro lado, há países em que a

taxa de prevalência é mais elevada, demonstrando, a transmissão por via sexual e a contaminação por outra via compartilhada pelos parceiros, como prática de medicina alternativa. Recentemente, um trabalho demonstrou prevalência do HCV de 4% entre pais e contatos intra-domiciliares. Comparando casais japoneses e não-japoneses, a prevalência é de 17 e 10,4% respectivamente, com concordância genotípica de 66% entre contatos não sexuais e 74% entre contatos sexuais (Ackerman, 2000).

Observam-se taxas de prevalência semelhantes entre casais heterossexuais e casais homossexuais masculinos, demonstrando que esta é uma forma de transmissão do HCV de pouca importância (Thomas *et al.*, 1995).

A via de transmissão vertical apresenta prevalência variável entre as diferentes regiões do mundo, no Egito, chega a 36% (kassem *et al.*, 2000). Em países desenvolvidos como Alemanha, Inglaterra e Irlanda, o risco é baixo, de 0,16 a 6,7%. Partos cesáreas são associados a menor risco de transmissão do HCV (Ades *et al.*, 2000; Gibb *et al.*, 2000; Hillemanns *et al.*, 2000).

A transmissão perinatal é baixa, da ordem de 5 a 6%, podendo chegar a 17% nos casos de co-infecção materna com HIV. A amamentação e o tipo de parto aparentemente não aumentam o risco de transmissão (Alter *et al.*, 1994; Booth *et al.*, 1995; Dienstag, 1997; Marcellin *et al.*, 1999; Wasley e ALTER, 2000).

É fundamental a detecção do HCV-RNA para a avaliação do risco de contaminação do recém-nato. O risco de transmissão do HCV está diretamente relacionado à carga viral materna. Acredita-se não haver

transmissão do vírus quando a viremia da mãe for inferior a 10^6 Eq/ml medida por bDNA ou PCR (Lin *et al.*, 1994; Ogasawara *et al.*, 1993; Ohto *et al.*, 1994), não havendo trabalhos que demonstrem a transmissão nos casos de portadores não virêmicos (Novati *et al.*, 1992).

Receptores de órgãos transplantados formam um grupo de alto risco de aquisição do HCV. Pode ocorrer por: transfusão sangüínea durante o transplante; recorrência de infecção pelo HCV adquirida pelo receptor pré-transplante ou presença do HCV no órgão doador (Carrilho e Clemente, 2003).

Outras formas de transmissão são acupuntura, *piercing*, tratamento dentário, tatuagem, hemodiálise e o contato intra-domiciliar (Ko *et al.*, 1992; Alter *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1994; Alter *et al.*, 1997). Em cerca de 40 a 60% dos casos, entretanto, não é possível identificar a forma de aquisição da infecção pelo HCV, o que caracteriza a forma esporádica da doença (ALTER *et al.*, 1992; SHAHARA *et al.*, 1996). A presença de HCV-RNA em saliva, líquido seminal, líquido ascítico e urina levanta a possibilidade de existirem outras formas de transmissão do HCV, não parenterais (Liou *et al.*, 1992).

1.3 História Natural da Hepatite pelo HCV

A história natural da hepatite C continua sendo assunto controverso, pela escassez de estudos de longa duração (Kenny-Walsh, 1999; Rehmann, 2000).

A infecção aguda pelo HCV é geralmente assintomática, com curso sub-clínico e, por isto, raramente diagnosticada. Icterícia, fadiga, mialgia,

febrícula, náusea, vômito e dor no quadrante superior direito são sinais e sintomas encontrados em 10 a 20% dos pacientes e, quando presentes, se associam a maior taxa de clearance do vírus do que aquela observada em pacientes assintomáticos (Alter, 1999).

Em 50 a 80% dos casos, a infecção evolui para a forma crônica, de curso lento e insidioso, com aparecimento de lesões hepáticas significativas após 15 anos de evolução (Koretz *et al*, 1993; Alter *et al*, 1994). Entre os indivíduos que apresentam curso crônico da infecção, 20 a 40% desenvolvem cirrose após 20-30 anos, e em cerca de 20% dos casos pode surgir o hepatocarcinoma (HCC), após mais de 30 anos de infecção (MMWR, 1991; Takano *et al*, 1995; Poynard *et al.*, 1997), entretanto a evolução da patologia hepática é insignificante nas duas primeiras décadas de infecção (Harris *et al.*, 2002). Durante a fase crônica, 30% dos pacientes evoluirão de forma assintomática, sem fibrose significativa ou evidência de disfunção hepática grave, apesar das enzimas persistentemente elevadas (Wasley e Alter, 2000). Em 30% dos casos, a elevação persistente das aminotransferases se traduz por fibrogênese e insuficiência hepática progressiva. Nos 40% restantes, a evolução é variável.

Alguns fatores parecem ser determinantes de evolução mais desfavorável da doença, com progressão mais rápida da fibrose. O hábito crônico de ingerir bebidas alcoólicas (Westin *et al.*, 2002; Takimoto *et al.*, 2002) e a co-infecção com outros vírus, como o vírus da hepatite B (HBV) e o HIV (Fernandez *et al.*, 2002), sexo masculino e idade de aquisição da infecção (Poynard *et al.*, 2001) podem alterar desfavoravelmente o curso da

doença (Demitri *et al.*, 1995). Alta carga viral, genótipo 1b, heterogeneidade das *quasispecies*, duração da infecção e características imunológicas e genéticas do portador também têm sido fatores relacionados à progressão da doença (Lau *et al.*, 1993; Cuthbert, 1994; Enomoto *et al.*, 1994; Booth *et al.*, 1995). Estudos mais recentes mostraram que a carga viral não prediz a evolução histológica e, para o genótipo 1, há controvérsias se o mesmo representa um fator independente de pior evolução histológica, com alguns trabalhos lhe atribuindo a capacidade de acelerar a evolução para cirrose (Soto *et al.*, 1997; Lauer *et al.*, 2001), contudo, outros estudos não comprovam esta observação (Poynard *et al.*, 2001). O aumento do ferro no soro, da saturação da transferrina e da ferritina também são relacionados a um pior prognóstico evolutivo (Arber *et al.*, 1994).

O estudo de Poynard (1997), que procurou determinar fatores preditivos relacionados à maior progressão para fibrose, identificou alguns fatores independentemente associados a um pior prognóstico: idade no momento da infecção (se a infecção é adquirida após os 40 anos de idade a progressão para fibrose é mais rápida), duração da infecção, consumo de álcool e sexo masculino (Poynard *et al.*, 1997). Estudo recente mostrou que a ingestão de álcool não parece influir na progressão da fibrose em estágios iniciais desta (estágio F1 de fibrose, segundo METAVIR), porém, nos outros estágios de fibrose (F2, F3 e F4 segundo METAVIR) ocorrem diferenças na progressão após 10 anos de infecção (Poynard *et al.*, 2001) permanecendo incerto se o abuso de álcool na infecção crônica pelo HCV apresenta efeito sinérgico ou aditivo (Verbaan *et al.*, 1998).

A mortalidade na infecção pelo HCV está principalmente relacionada à evolução para a cirrose hepática, que parece ocorrer em 15-20% dos pacientes, com complicações como insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular (HCC) (Tong *et al.*, 1995; Poynard *et al.*, 1997; Niederau *et al.*, 1998; NIH, 2000). São considerados fatores de risco de HCC em cirróticos: genótipo 1b, sexo masculino e idade acima de 60 anos (Bruno *et al.*, 1997). Outros autores demonstraram a evolução para HCC na ausência de cirrose, associada ao genótipo 1b e longo período de infecção (De Mitri *et al.*, 1995). Enquanto outros associaram a infecção pelo genótipo 1b, a presença de *quasispecies* e carga viral elevada com resposta ruim à terapia com interferon, evolução para cirrose e maior risco de HCC (Enomoto *et al.*, 2002; Farci *et al.*, 2002).

A ocorrência de hepatite fulminante associada ao HCV ainda é alvo de controvérsia; casos de infecção com evolução fulminante são raros no Ocidente e relatados com maior frequência em países orientais. Outros trabalhos demonstraram que o HCV não causa hepatite fulminante, pois nesta o vírus seria clareado rapidamente da circulação e o fígado necrótico seria impróprio para manter a replicação viral (Sallie *et al.*, 1991; Wright *et al.*, 1991; Yoshida *et al.*, 1991; Akbar *et al.*, 1992; Booth *et al.*, 1995; Kawatani *et al.*, 2001).

Há associação de infecção pelo HCV com diversas patologias extra-hepáticas. Entre as doenças linfoproliferativas, a crioglobulinemia mista essencial (CME) e o linfoma não-Hodgkin são as mais frequentes; outras patologias, como macroglobulinemia de Waldenström, mieloma múltiplo e

gamopatias monoclonais também têm sido associadas ao HCV. A CME é a manifestação extra-hepática mais documentada; há outras patologias em que a associação é sugerida, porém sem confirmação suficiente, entre elas: fibrose pulmonar idiopática (FPI), líquen plano (LP), Síndrome de Sjögren (SS), tireoidite auto-imune (TAI) e porfiria cutânea tarda (PCT).

Na Tireoidite auto-imune, a alta prevalência de disfunção tireoidiana, de anticorpos anti-tireoidianos como: anti-microsomal, tireoglobulina e anti-peroxidase são encontrados em 30% dos pacientes com hepatite crônica pelo HCV. Admite-se que o HCV esteja envolvido na patogênese da Síndrome de Sjögren e haja como um gatilho no desencadeamento da alveolite na fibrose pulmonar idiopática. Dentre as manifestações dermatológicas, a vasculite leucocitoplástica é a mais freqüentemente observada na crioglobulinemia mista essencial. Já na porfiria cutânea tarda observa-se uma prevalência de HCV de 50% e admite-se que este vírus funcione como gatilho em pacientes predispostos geneticamente. A associação com líquen plano é muito controversa (Zignego *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2002).

1.4 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial da hepatite pelo HCV é realizado utilizando-se três categorias de provas laboratoriais: testes bioquímicos, imunoenzimáticos (EIA) e de biologia molecular.

1.4.1 Testes bioquímicos

As provas bioquímicas são as primeiras a serem realizadas, muitas vezes sem o intuito de diagnosticar a hepatite C, mas com seus resultados alterados, acabam por orientar o médico na solicitação de novos exames que irão fazer o diagnóstico. A dosagem da alanina-aminotransferase (ALT) é o principal marcador bioquímico de lesão hepática, porém nem todos os pacientes com viremia apresentam elevação desta enzima (Alter *et al.*, 1992; Hoofnagle *et al.*, 1997). Embora a alteração dos níveis de ALT indique lesão hepática, seus níveis dentro dos valores de referência não asseguram que o paciente terá biópsia hepática normal, isto é de especial interesse em pacientes com insuficiência renal e nos pós-transplantados renais e cardíacos (Perrillo *et al.*, 1997). Cerca de 25% dos pacientes com hepatite crônica pelo HCV, apresentam níveis persistentemente normais de ALT, principalmente mulheres, sem paralelismo entre níveis normais desta enzima e histologia hepática normal (Puoti *et al.*, 1997; Marcellin *et al.*, 1999; Jacobson, 2000). Não sendo os níveis desta enzima preditivos de severidade de diagnóstico histológico (Perrillo *et al.*, 1997). Embora, baixos grau e estágio de lesão hepática com ALT normal sejam muito descritos (Mathurin *et al.*, 1998; Persico *et al.*, 2000), a ALT, apresenta um padrão de atividade flutuante característico nesta patologia, esta flutuação pode indicar o surgimento de *quasispecies* e/ou incremento da carga viral (Haber *et al.*, 1995; Alter *et al.*, 1992; Koretz *et al.*, 1993; Hoofnagle, 1997). A elevação dos níveis de ALT está presente em 60 % dos pacientes com hepatite crônica pelo HCV, sendo um fator

indicativo de continuidade da infecção e de lesão hepática. Níveis acima de 350 UI/L estão associados à necrose em saca-bocado (Haber *et al.*, 1995; Perrillo *et al.*, 1997; Marcellin *et al.*, 1999).

A Gama GT se encontra elevada em muitos pacientes com infecção crônica pelo HCV (Giannini *et al.*, 2001). Alguns trabalhos sugerem que níveis elevados desta enzima antes do tratamento indicariam resposta desfavorável (Ebeling *et al.*, 2001), enquanto outros associam níveis altos desta enzima com graus mais intensos de inflamação e desarranjo do arcabouço da estrutura hepática, sugerindo a importância da GGT como marcador indireto de gravidade histológica (SILVA, 1999).

1.4.2 Testes Sorológicos

Os testes imunoenzimáticos podem identificar anticorpos e/ou antígenos do HCV. A análise e o isolamento do DNA complementar do genoma do HCV e o desenvolvimento subsequente de um ensaio para detecção do anticorpo para o HCV (anti-C100-3) foi o *breakthrough* para a pesquisa clínica e básica das hepatites não-A, não-B (CHOO *et al.*, 1989). Os testes sorológicos que detectam anticorpos contra o vírus C (anti-HCV), foram os primeiros testes imunoenzimáticos utilizados para diagnóstico do HCV, sendo a forma mais prática de identificar contato, infecção atual ou pregressa e, de suma importância na investigação inicial como teste de triagem. Possuem alta sensibilidade e vêm sendo aprimorados, com a incorporação de antígenos das regiões estruturais e não estruturais na tentativa de possibilitar o diagnóstico mais precoce

(Kuo *et al.*, 1989; Mc Farlane *et al.*, 1990; Alberti, 1991; Katayama *et al.*, 1992; Weiland e Schvarcs, 1992; Barrera *et al.*, 1995). Há três gerações de testes, EIE-1, EIE-2 e EIE-3.

1.4.3 Ensaio imunoenzimático – EIE

Os testes imunoenzimáticos de primeira geração (KUO *et al.*, 1989) utilizavam um clone que produziu a proteína 5-1-1, e foi expandida e fundida para originar o antígeno C100-3 da região não estrutural, com sensibilidade de 80%, para a detecção das Hepatites Pós Transfusionais (HPT), sendo licenciado e recebendo liberação do *Food and Drug Administration (FDA)* dos Estados Unidos em maio de 1990, um avanço para triagem e diagnóstico do HCV nos bancos de sangue, levando a diminuição do número de casos (Alter *et al.*, 1990) de HPT da ordem de 10% antes do seu emprego para 0,5 a 1% após sua utilização (Alter *et al.*, 1992). Nesta época, observou-se que a imunoglobulina IgG1 era a mais freqüente nas hepatites aguda e crônica, e que a IgG3 a primeira a surgir, era positiva na hepatite fulminante pelo HCV e mesmo quando o anti-HCV estava negativo. Este teste apresentava dois problemas fundamentais: a baixa especificidade (Mc Farlane *et al.*, 1990), com resultados falso positivos em pacientes com hepatite autoimune, e a demonstração tardia da soroconversão (15 semanas após os primeiros sintomas da doença, com janela de 12 a 26 semanas) (Mc Farlane *et al.*, 1990; Alberti, 1991; MMWR, 1991; Alter *et al.*, 1995).

Surgiram então os testes de segunda geração, licenciados em março de 1992 e conhecidos como multiantígenos, que incorporavam epítomos, da

proteína do core, c-22 e c-33 da região não estrutural NS3, com ganho de sensibilidade, 90- 95%, e discreto ganho em especificidade quando comparado aos de primeira geração (Van Der Poel *et al.*, 1991; Katayama *et al.*, 1992). A falta de especificidade foi associada a: soro antigo, hiperglobulinemia, soro com fator reumatóide e pacientes recém vacinados para influenza (Alter, 1995). A detecção do anti-HCV passou a ser obtida mais precocemente, após dez semanas de infecção (Weiland e Schvarcs, 1992). Nesta época, foi desenvolvido um teste EIE para detecção de anticorpo do nucleocapsídeo (core) do vírus C, utilizando a proteína p22, sendo o anti-p22 detectado bem mais cedo que o anti-C100-3 (Katayama *et al.*, 1992).

Os testes de terceira geração incorporaram antígeno da região não estrutural NS5, além daqueles já utilizados nos ensaios de segunda geração, exceto C100-3 que foi retirado, com ganho de sensibilidade, 97%, porém sem ganho de especificidade. O período de latência para detecção do anti-HCV após início da infecção, passou a ser de duas a três semanas (Barrera *et al.*, 1995; Gretch *et al.*, 1997).

A ordem de frequência dos anticorpos nos pacientes infectados pelo HCV é: NS3> c22> NS5> c100-3> E1> E2 enquanto que a reatividade da população parece ser: E1/E2>c22-3>c33c>c100-3>5-1-1>NS5. Os anticorpos 5-1-1, c100-3 e E1 podem desaparecer espontaneamente durante imunossupressão ou após terapia com interferon; anticorpos contra c22-3 e c33c raramente desaparecem nos infectados crônicos e raramente desaparecem nos curados (Tong *et al.*, 1995; Alter *et al.*, 1995; Barrera *et al.*, 1995).

1.4.4 Ensaio do tipo *imunoblot*

Apesar dos avanços, persistiam os resultados falso-positivos. Houve necessidade de se desenvolver testes confirmatórios com maior especificidade e menor sensibilidade, denominados *imunoblot*, *Recombinant Immunoblot Assay* (RIBA, CHIRON®) e *Line Immunoassay* (INNOLIA, IMMUNOGENETICS®) que possuem os mesmos antígenos do teste sorológico, porém que detectam a reatividade de cada antígeno independentemente, em fita de nitrocelulose, melhorando a especificidade e diminuindo os casos falso positivos (VAN der Poel *et al.*, 1991; Ebeling *et al.*, 1991). Sendo considerado positivo o teste que possuir reatividade para pelo menos uma banda (antígeno) com pelo menos dois graus de intensidade.

Alguns autores demonstraram haver forte correlação entre o valor da densidade óptica (DO) obtido no teste *enzyme linked immuno assay* (Elisa) e o imunoblot, estabelecendo o nível de corte, em três vezes a DO (Menitove *et al.*, 1990; Santos, 1997).

Contudo, os testes de Elisa e imunoblot, só detectam anticorpo, não indicando se o paciente alberga o vírus ou não.

1.4.5 Testes para detecção do antígeno do core do HCV

Recentemente foram desenvolvidos testes imunoenzimáticos que detectam antígenos. Com a identificação sorológica do HCV na fase de janela imunológica, pré-soro-conversão, através da detecção do antígeno do nucleocapsídeo (core) do vírus da hepatite C (Peterson *et al.*, 2000) pelo teste de Elisa (ORTHO®).

Possuindo elevadas sensibilidade e especificidade, parece ter boa correlação entre a presença do antígeno core e a positividade do HCV-RNA por PCR qualitativo (Tanaka *et al.*, 2000). Apresenta especificidade de 100% de acordo com os primeiros estudos divulgados. É importante em bancos de sangue, pois o ensaio positiva-se poucos dias após o contágio (Tanaka *et al.*, 2000). Ele oferece também a possibilidade de avaliar a carga viral (Widell *et al.*, 2002), com boa correlação com o PCR quantitativo, auxiliando desta forma na avaliação da resposta terapêutica. Este ensaio ainda não está sendo realizado de rotina, sendo necessários estudos complementares para comprovar sua eficácia.

1.4.6 Testes Moleculares

1.4.6.1 Pesquisa do HCV – RNA – teste qualitativo

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular possibilitou a identificação direta do genoma viral do HCV-RNA, tornando-se fundamental para o diagnóstico precoce, confirmação diagnóstica e diagnóstico em imunossuprimidos, assim como para controle de tratamento e valor prognóstico. É considerado o *padrão ouro* para diagnóstico de viremia, possui altas sensibilidade e especificidade, permitindo o diagnóstico mesmo em situações de baixa carga viral e janela imunológica (Shindo *et al.*, 1991; Farci *et al.*, 1991).

Há vários testes desenvolvidos, tanto para ensaios qualitativos como quantitativos, porém os mais utilizados são: Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), técnica do DNA Ramificado (b-DNA ou Branched DNA),

Nucleic Acid Sequence Based Assay (NASBA) e aqueles usados em laboratório específico (*in house*).

O PCR (ROCHE®) consiste, esquematicamente, na transcrição reversa do RNA do HCV, originando um DNA complementar, seguido por amplificação de seqüências específicas por reação em cadeia da polimerase (Dusheiko, 1994).

O b-DNA (CHIRON®) é um teste tipo “*sandwiche*” de amplificação do sinal, para quantificar o HCV-RNA. Consiste na captura do RNA do HCV por hibridização em microplacas, seguido da utilização de sondas marcadas que se ligam ao RNA capturado e revelação por quimioluminescência (Urdea, 1994; Collins *et al.*, 1997).

No NASBA (ORGANON®), ocorre a amplificação direta do genoma do HCV, sem a necessidade da etapa de transcrição reversa. Baseia-se na atividade simultânea da transcriptase reversa do vírus da mieloblastose das aves, da enzima t7 RNA polimerase e da RNase H na amplificação isotérmica de uma seqüência alvo de RNA ou DNA (Lunel *et al.*, 1999).

O PCR *in house*, embora muitas vezes mais sensível e mais barato que os testes comerciais, possui grande problema com contaminação e padronização da técnica (Okamoto *et al.*, 1990; Shindo *et al.*, 1991; Damen *et al.*, 1996).

Para obter o melhor resultado, as condições ideais de coleta e armazenamento devem ser seguidas, com separação do soro imediatamente após formação do coágulo e descongelamento de no máximo três vezes (Davis *et al.*, 1994).

1.4.6.2 Pesquisa do HCV – RNA - teste quantitativo

O teste quantitativo permite determinar a carga viral do HCV na corrente sanguínea, os métodos mais utilizados são: Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e técnica do DNA Ramificado (b-DNA ou Branched DNA).

Uma das maiores dificuldades enfrentadas pelos profissionais que necessitam da avaliação virológica quantitativa e/ou qualitativa da infecção pelo HCV é a multiplicidade de métodos existentes e, Conseqüentemente a diversidade das formas de apresentação dos resultados. Foi sugerido recentemente o uso de medida padrão para a determinação do HCV-RNA, permitindo melhor avaliação do paciente infectado. Os resultados são, neste novo modelo, expressos em UI/ml e não mais através de cópias/ml. Foi estabelecido que 2.000.000 cópias/ml (6,3 log cópias/ml) correspondem a 800.000 UI/ml (5,9 log UI/ml) e 3.500.000 cópias/ml (6,5 log cópias/ml) a 1.300.000 UI/ml (6,1 log UI/ml), sendo que a sensibilidade dos testes permite a detecção de 50 UI/ml na avaliação qualitativa e de 600 UI/ml na quantitativa. É importante, entretanto, ressaltar que a correlação não é linear, não havendo uma fórmula que permita a conversão (Pawlotsky *et al.*, 2000).

1.4.6.3 Genotipagem

Entre os testes de biologia molecular, os mais usados para identificação dos genótipos do HCV são: Sequenciamento, PCR com seqüências iniciadoras (primers) específicas e Análise de Polimorfismo com enzimas de Restrição (restriction fragment length polymorphism, RFLP).

Entre os testes comerciais, há a hibridização pós PCR com sondas específicas, como Line Immune Probe Assay (Innolipa, Immunogenetics®) (Lau, 1998; Morishima e Gretch, 2000).

O sequenciamento de uma determinada região do genoma viral é o método mais específico para a classificação do genótipo do HCV.

A genotipagem pode ser realizada, utilizando PCR com seqüências iniciadoras específicas, construídas com a seqüência complementar da região do HCV, específica para cada genótipo.

A RFLP utiliza enzimas de restrição que irão clivar por digestão do produto do PCR, regiões de restrição do genoma do HCV, específicas para cada genótipo.

O INNOLIPA utiliza sondas marcadas adsorvidas em tiras de nitrocelulose. O produto do PCR da região 5' do genoma do HCV dos pacientes, sofre hibridização pelas sondas, quando a seqüência for complementar a do genótipo.

1.5 Diagnóstico Histopatológico

1.5.1 Biópsia Hepática

A análise histológica do tecido hepático é fundamental na avaliação diagnóstica e prognóstica dos pacientes com infecção crônica pelo HCV (Schiff *et al.*, 1999).

Em 1956, Mackay et al., criaram o conceito de hepatite crônica ao realizarem a descrição clássica da hepatite lúpóide, hoje denominada hepatite autoimune. A partir de então, uma série de critérios de classificação das hepatites crônicas tem sido adotada.

A primeira classificação de Degroote et al., em 1968, teve como critério fundamental a integridade da placa limitante lobular; dois anos após, Boyer e Klatskin (1970) observaram a importância da lesão parenquimatosa lobular e da necrose hepática em ponte na progressão da hepatite crônica para cirrose; em 1971, Popper e Schaffner introduziram na classificação da descrição histológica da atividade da doença, as lesões lobulares.

Em 1981, Knodel et al. criaram um índice histológico de atividade da hepatite crônica, que foi graduado, segundo critérios semi-quantitativos: a necrose periportal, necrose intra lobular, inflamação portal e fibrose. Este critério vem sendo utilizado até hoje no diagnóstico, prognóstico e monitorização terapêutica dos pacientes. Em 1994, Desmet et al. criaram nova classificação, baseando-se na etiologia, no grau de atividade portal e periportal, grau de estadiamento e atividade lobular, que passaram a ser analisados separadamente.

A histologia na hepatite crônica pelo HCV pode variar de alterações discretas inespecíficas até cirrose, associada ou não ao carcinoma hepatocelular. Sua avaliação histológica está baseada na extensão da fibrose e desenvolvimento de cirrose.

Embora não tenha sido descrito nenhum marcador histológico etiológico patognomônico até o momento, há três achados frequentes e

característicos da hepatite pelo HCV: esteatose hepática, lesão de ducto biliar e agregados e/ou folículos linfóides (Scheuer *et al.*, 1991; Gerber, 1995; Goodman e Ishak, 1995).

A biópsia hepática está indicada antes do tratamento, para avaliar a extensão da doença, permitindo análise prognóstica e também para afastar outras patologias associadas. Quando a atividade for mínima, ou o tratamento não estiver indicado, sua repetição deverá ser feita a cada três a cinco anos (Booth *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1997).

A biópsia tem auxiliado no monitoramento do tratamento observando-se, nos pacientes respondedores, melhora da necrose, da lesão acinar e da inflamação portal (Goodman e Ishak, 1995).

Os linfócitos são as células do sistema imune mais comuns no fígado infectado pelo HCV. No espaço porta, encontra-se principalmente linfócito CD4, enquanto que no lóbulo, linfócito CD8. A quantidade de linfócitos se correlaciona com níveis de ALT e com o grau histológico da doença, sugerindo que eles promovem lesão hepática (Rehermann e Chisari, 2000).

Os linfócitos CD4 são encontrados principalmente nos folículos linfóides, onde ocorre a apresentação dos antígenos do HCV ao linfócito B. Os CD4 intra-hepáticos secretam principalmente citocinas Th1, as quais estão elevadas na hepatite crônica C, correlacionando-se com a severidade da inflamação e da fibrose hepática (Rehermann e Chisari, 2000).

1.6 Imunopatogênese da Infecção pelo HCV

O HCV é um vírus RNA da família *Flaviridae*, que pode causar hepatite aguda com resolução espontânea ou, mais freqüentemente, evoluir para a cronicidade, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (4 a 8% ao ano, o dobro do número dos pacientes que têm cirrose pelo HBV) (Lamonaca *et al.*, 1999; Hiroishi *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 2000). A hepatite aguda é geralmente assintomática, evoluindo em cerca de 85% dos casos para a forma crônica, porém, quando aparecem os sintomas (em 30% dos pacientes), a resolução da doença é bem mais comum (40-60% dos casos) (Giuberti *et al.*, 1994; Gerlach *et al.*, 1999; Orland *et al.*, 2001). A lesão celular depende da interação vírus-hospedeiro: quanto mais forte a resposta imune, maior a lesão celular, podendo levar ao óbito, fato observado com maior freqüência na hepatite fulminante, porém, raramente, na hepatite pelo HCV. Quando há exposição sem fixação do vírus, não ocorre doença. Já por outro lado, quando há fixação e a replicação viral ocorre sem lesão celular, a infecção será inaparente, com disfunção celular e doença clínica (Peters, 1998).

O mecanismo responsável pela persistência e/ou clareamento viral ainda não é bem conhecido, entretanto a presença de linfócitos T específicos contra o HCV no fígado, o aparecimento de viremia sob imunossupressão, características auto-imunes, e a deterioração da doença na co-infecção com o HIV, são características que sugerem que um mecanismo imuno-mediado seja fundamental na lesão hepática causada

pelo vírus e talvez também na eliminação do HCV (Lamonaca *et al.*, 1999; Gerlach *et al.*, 1999; Rehermann e Chisari, 2000).

1.6.1 Componentes da Resposta Imune Antiviral

Fatores virais como: tamanho, rota de entrada, composição genética do inóculum e taxa de replicação viral determinam a cinética com que as células dos pacientes serão infectadas, e determinam a resposta imune que será desenvolvida.

O mecanismo de entrada do HCV na célula do hospedeiro ainda é desconhecido. Sabe-se que o acesso deste vírus aos hepatócitos se realiza através de vários receptores celulares que permitem, a partir das glicoproteínas E1, E2 ou de ambas em conjunto, sua entrada nos hepatócitos. Esta internalização pode ser mediada por receptores LDL, através da endocitose (MONAZHIAN *et al.*, 1999). Esta ligação pode ocorrer também através de moléculas da família dos glicosaminoglicanos, com a entrada mediada por outros receptores de alta afinidade (Takikae *et al.*, 1999). Há evidências de que anticorpos monoclonais anti-CD81 inibem a ligação da proteína E2 com células que serão infectadas (FLINT *et al.*, 2000). Em seguida ele entrará no organismo, utilizará o maquinário do paciente, tornar-se-á persistente com ou sem lesão hepática e se espalhará pelo organismo para evitar sua eliminação. A lesão hepática decorre: do mecanismo celular, da alteração da função da membrana celular, ou devido a produtos virais (Peters, 1998; Rehermann e Chisari, 2000).

1.6.1.1 Resposta Imune Inespecífica

A primeira linha de defesa do organismo é constituída por: complemento, interferon alpha e beta, macrófagos, neutrófilos, células assassinas naturais *NK* (*natural killer*) e anticorpos naturais.

O interferon controla a replicação viral, a entrada do vírus na célula, regula as proteínas de membrana essenciais para o reconhecimento imune, e ativa as células *NK*. Estas por sua vez destroem as células alvo pelo contato direto, através da liberação de perforinas e granzimas. Os anticorpos e o complemento opsonizam e/ou destroem os antígenos. Com isto, a resposta imune inespecífica pode controlar a viremia, porém não consegue erradicá-la (Peters, 1998; Rehmann e Chisari, 2000).

1.6.1.2 Resposta Imune Específica

O mecanismo que o HCV utiliza para evitar a resposta imune e permitir a persistência viral não está bem definido, contudo a resposta imune específica é iniciada por macrófagos e células dendríticas que apresentam as proteínas virais às células B, células T auxiliaadoras e células T citotóxicas (Rehmann *et al.*, 2000).

A memória imunológica, a ativação das células T citotóxicas e os anticorpos neutralizantes são os responsáveis pelo clareamento viral e pela recorrência da viremia. Enquanto os linfócitos T citotóxicos promovem o clareamento viral, os anticorpos neutralizantes protegem de re-infecções, e de que o vírus se espalhe pela corrente sanguínea.

1.6.2 Resposta Imune Celular

A resposta celular imune depende da interação direta entre o linfócito T e a célula apresentadora de antígeno (APC) que a célula T reconhecerá. A função do linfócito T consiste em reconhecer os antígenos virais expressos na superfície das células infectadas e agir destruindo-as para eliminar o vírus. Eles agem liberando a perforina que forma orifícios na membrana celular das células alvo e, liberando a granzima no interior da célula infectada ativa a morte celular.

Os linfócitos T ativados demonstram expressão aumentada do ligante Fas e do fator de necrose tumoral (TNF) α . Quando a célula alvo é sensível ao ligante Fas ou ao TNF- α , o linfócito T ativado lesa a mesma (estando ou não infectada) pela liberação de sinais de apoptose mediado pelo Fas do complexo antígeno/Fas ligante e pelo sistema TNF- α . Estes sistemas possuem citotoxicidade menor que a perforina e atacam também células não infectadas que apresentam sensibilidade por lesão celular no local da inflamação. A perforina por sua vez, além de ter ação citotóxica mais forte, lesa apenas as células infectadas.

Embora os anticorpos neutralizantes e os linfócitos T estejam envolvidos na eliminação do vírus dos fluidos biológicos e na morte das células infectadas respectivamente, a produção de anticorpos e a proliferação e ativação dos linfócitos T são controladas pelas células T auxiliaadoras. Estas são ativadas, quando reconhecem os antígenos virais apresentados pelas APC: células dendríticas, macrófagos e células B.

Quando ativada, a célula T auxiliadora tipo 1 (Th1), está envolvida com a resposta imune celular, produzindo as citocinas interleucina (IL)-2, TNF- α e INF-gama que vão acelerar a proliferação e ativação dos linfócitos T citotóxicos e células NK, aumentando o reconhecimento imune dos antígenos virais pela ativação de moléculas HLA nas células infectadas, assim como estimulando a produção de óxido nítrico pelos macrófagos (Sharara *et al.*, 1997) e hepatócitos (Nussler *et al.*, 1992) induzindo resistência à infecção viral nas células vizinhas.

As células T, auxiliaadoras tipo 2 (Th2), estão envolvidas com a resposta imune humoral e produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, que promovem a proliferação, ativação e diferenciação das células B, com a produção de anticorpos.

Quando o complexo MHC classe II/peptídeo interage fortemente com o receptor de célula T (TCR), ocorre preferencialmente a geração de células semelhantes às Th1, enquanto que quando a ligação é fraca a resposta Th2 predominará (Pfeiffer *et al.*, 1995).

A IL-12, produzida pelas células apresentadoras de antígenos (APC) após estímulo das células T, age sobre as células Th1, linfócitos T citotóxicos e células NK levando a eliminação do vírus e supressão da replicação viral. Por outro lado, a IL-10 produzida pelas células Th2, age sobre as APC para impedir a ativação das células Th1, pela diminuição da produção de IL-12, levando ao fim da resposta imune celular contra o vírus.

Desta forma, a distribuição dos linfócitos T intra-hepáticos entre fenótipo Th1 ou Th2 parece exercer um papel fundamental na inflamação hepática e evolução final da infecção (Bertoletti *et al.*, 1997).

As células T são especializadas em reconhecer antígenos estranhos, como peptídeos fragmentados, ligados à superfície celular por glicoproteínas chamadas de complexo maior de histocompatibilidade (MHC). Há três tipos de moléculas de MHC. As moléculas MHC classe I, estão expressas em diversos tipos celulares e são reconhecidas por linfócitos T com moléculas CD8 (*cluster differentiation* 8); são três os tipos de genes classe I, HLA-A, HLA-B e HLA-C. As moléculas MHC classe II estão expressas em células dendríticas, macrófagos e células B, sendo reconhecidas pelas células auxiliaadoras T com moléculas CD4; há três pares de genes de cadeia alpha e beta de MHC classe II, chamados HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ.

O mecanismo proposto seria: as proteínas endógenas produzidas no citosol são clivadas e degradadas em fragmentos de peptídeos pelo proteossomo, os fragmentos são transportados do citosol para o retículo endoplasmático (ER) por proteínas conhecidas como transpotadores associados a processamento de antígeno (TAP), há dois tipos de TAP: TAP1 e TAP2. Em seguida, ligam-se às moléculas classe I do MHC, o complexo MHC-peptídeo é transportado através do complexo de Golgi para a superfície celular, onde são apresentados pelas moléculas MHC classe I para as células T CD8, que destruirão as células infectadas por apoptose, mediada por perforina, granzima e ativação do ligante Fas (Guidotti *et al.*, 1994).

Os antígenos exógenos são levados para vesículas intracelulares das APC: células dendríticas, macrófagos e células B são degradados e apresentados pelas moléculas MHC classe II para as células T CD4, que desempenham função antiviral e citotóxica (Minutello *et al.*, 1993).

Alguns genes como os componentes do complemento: C2, C4 e Fator B; TNF-alpha e TNF-beta são chamados de genes de MHC classe III (Nakamura e Imawari, 2000; Rehmann e Chisari, 2000; Rehmann *et al.*, 2000).

1.6.3 Resposta Imune na Infecção pelo HCV

A reação imunológica contra o HCV ocorre na maioria dos indivíduos infectados. Isto fica evidente ao observar-se auto-anticorpos no soro, manifestações extra-hepáticas de doenças auto-imunes, respostas de células B e T e doença hepática. Os auto-anticorpos são comumente encontrados, porém em baixos títulos (Diepolder *et al.*, 1996).

Parece haver na infecção aguda alguma correlação entre resposta rápida e precoce de células T e possível clareamento viral.

O clareamento viral decorre do balanço entre a resposta imune do paciente e a replicação viral. O equilíbrio pode ser alcançado por fatores do doente (CTL, células B, HLA e resposta não-específica) e fatores virais (carga viral, genotipagem e *quasiespecie*). Por outro lado, pode ser alterado por: imunossupressão, drogas anti-virais e drogas que ativam a resposta imune. Para que ocorra o clareamento viral, vários fatores devem ocorrer simultaneamente como: diminuição da viremia e ativação da resposta

inespecífica (células NK, interferon e complemento) e específica do CTL. Sendo a resposta imune do paciente responsável por ambos, pelo clareamento viral e pela lesão celular (Peters, 1998; Nelson *et al.*, 2001).

1.6.3.1 Resposta Imune Humoral

O HCV pode causar infecção crônica apesar de uma resposta imune celular e humoral ativa. O vírus pode escapar da resposta imune, quando a cinética da infecção e a replicação viral não permitirem que os anticorpos promovam completa neutralização após a primo-infecção. Embora os anticorpos anti-HCV interfiram na entrada do HCV na célula, opsonizando-os para posterior eliminação pelos macrófagos, eles não conseguem eliminar o vírus das células infectadas.

Os anticorpos são detectáveis 7-31 semanas após a infecção, em ordem decrescente: anti-c33 (NS3), anti-c22 (CORE), contra as regiões NS4, E1 e por último E2. Na hepatite crônica, os anticorpos são dirigidos contra múltiplos epítopos virais. Por outro lado, o clareamento viral, a cura, é acompanhada de redução na quantidade de anticorpos contra o HCV. Alguns trabalhos demonstram que, altos títulos de anticorpos no início da infecção dirigidos contra HVR do envelope viral podem pelo menos modular ou até mesmo proteger contra a infecção pelo HCV (Zibert *et al.*, 1997); a resolução da infecção aguda pelo HCV estaria associada com o desenvolvimento precoce de anticorpos anti-gpE2 (Kobayashi *et al.*, 1997). Entretanto, a cura pode ocorrer mesmo em pacientes com agamaglobulinemia, demonstrando que o controle sobre o vírus pode ser alcançado mesmo sem anticorpos (Orland *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 1997).

Haverá menor eliminação viral espontânea quando a resposta humoral for tardia contra a extremidade amino da região hipervariável da proteína E2 e nos indivíduos de raça negra (Villano *et al.*, 1999). A persistência viral estaria associada à distribuição de *quasispecies* mais complexas e à maior complexidade da HVR1 (Farci *et al.*, 2000).

O HCV possui alta taxa de mutação, principalmente na região hipervariável (HVR1) das proteínas do envelope (E2) viral, e para dificultar ainda mais a defesa imune do paciente, a resposta imune humoral seleciona HCV mutantes que escapam ao reconhecimento dos anticorpos (Rehermann *et al.*, 2000; Chang, 2003).

Os linfócitos T auxiliares intra-hepáticos são dez vezes mais eficientes que os do sangue periférico, no auxílio das células B, para produzir imunoglobulina A (IgA). Esta compartimentalização talvez explique porque a produção contínua de anticorpos pode ser observada, mesmo não se detectando as células T auxiliares contra o HCV no sangue periférico (Minutello *et al.*, 1993).

Infelizmente, o anticorpo neutralizante contra o HCV ainda não foi detectado. Contudo, a diminuição dos níveis de anticorpos observada nos pacientes respondedores do tratamento com interferon, indica um papel decisivo dos anticorpos no clareamento viral (Yoshioka *et al.*, 1992).

A progressão para hepatite crônica parece ser um processo multifatorial que depende de múltiplos aspectos na interação paciente-vírus (Rehermann *et al.*, 2000).

1.6.3.2 Resposta Imunológica Celular

Uma resposta imune precoce vigorosa, multiespecífica e persistente de células CD4 e CD8 está associada à cura da hepatite pelo HCV. Após a cura diminuirão os níveis de anticorpos, podendo até desaparecer, entretanto as células CD4 e CD8 persistirão, sendo os únicos marcadores de infecção pregressa e da cura (Rehermann, 2000; Lechner *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2002; Chang, 2003).

1.6.3.2.1 Resposta da célula T auxiliadora, CD4

As células T CD4 são ativadas quando seus receptores se ligam ao complexo formado pelo peptídeo viral e as moléculas do MHC classe II. Com a produção de citocinas específicas, desempenham função imunomoduladora: através de mecanismo celular, onde Th1 produzirá IL2, TNF- α e INF-gama; ou da produção de anticorpos, onde Th2 secretará IL-4, 5, 6, 9, 10 e 13 (ORLAND *et al.*, 2001), e desta forma com ação antiviral direta (Orland *et al.*, 2001; Gerlach *et al.*, 1999).

Observações clínicas sugerem que eventos virais e imunológicos ocorridos nas primeiras semanas após a infecção podem determinar a evolução da hepatite C (Rehermann e Chisari, 2000).

A resposta imune vigorosa da célula T CD4 contra o HCV é necessária tanto no início da hepatite aguda C para a eliminação viral com a resolução da doença, quanto na fase tardia para um controle viral de longa duração (Gerlach *et al.*, 1999).

Alguns autores sugerem que quando a ação ocorre sobre a protease e a helicase da proteína não estrutural NS3, na região imunodominante do

amino ácido de posição 1251-1259, o qual se liga ativamente à molécula HLA classe II, os pacientes resolvem a infecção aguda pelo HCV mais freqüentemente (Diepolder *et al.*, 1995; Diepolder, 1997; Nakamura e Imawari, 2000). Enquanto outros demonstraram que a ação vigorosa, policlonal e multiespecífica do CD4 deveria ser dirigida contra antígenos estruturais e não-estruturais do genoma viral, para que estes pacientes conseguissem o clareamento viral e a cura (Missale *et al.*, 1996; Lamonaca *et al.*, 1999).

A resposta mais vigorosa, predominantemente de CD4 tipo Th1, com antecipação do estímulo sobre as células T citotóxicas (CTL) CD8, que elimina o vírus na fase aguda e que precisa ser mantida permanentemente para obter controle da viremia de longa duração, é mais observada em pacientes que alcançaram a cura. Enquanto que, a resposta menos vigorosa de CD4 tipo Th2, antecipando o estímulo de produção de anticorpos (não-citotóxica), é encontrada principalmente naqueles em que a infecção persistiu e cronicou. É possível, contudo, que as citocinas consigam controlar a replicação viral por mecanismos não citolíticos (Missale *et al.*, 1996; Nakamura e Imawari, 2000; Orland *et al.*, 2001).

Pacientes com a forma crônica da doença que apresentam resposta forte, com fenótipo Th1, estão associados com evolução mais favorável e com menos inflamação, além de conseguir controlar a viremia (Rehermann e Chisari, 2000).

Mesmo anos após a cura da hepatite aguda pelo HCV, uma vigorosa resposta de linfócitos T CD4 pode ser detectada na corrente sanguínea

periférica, sugerindo a existência de uma memória imunológica forte (Ferrari *et al.*, 1994; Missale *et al.*, 1996; Nakamura e Imawari, 2000).

1.6.3.2.2 Resposta da Célula T citotóxica, CD8

A célula T CD8 reconhece através do TCR o peptídeo viral, apresentado pelas moléculas do MHC classe I na superfície das células infectadas. A ativação destas células pelo complexo MHC/peptídeo pode levar ao controle viral e clareamento da viremia por meio citolítico e não citolítico (Orland *et al.*, 2001), sendo a atividade do linfócito T citolítico (CTL) inversamente proporcional à carga viral (HIROISHI *et al.*, 1997). O CTL além de ser a principal arma de defesa do paciente contra o HCV (clareamento), está também implicado na imunopatogênese (lesão hepática) da doença (Hiroishi *et al.*, 1997; He *et al.*, 1999; Lechner *et al.*, 2000; Imawari, 1998; Nelson, 1998).

A resposta multi-específica do CTL CD8 intra-hepático, na fase inicial da infecção, está associada ao clareamento do HCV. Assim como uma resposta forte e policlonal, no fígado e sangue periférico está associada a níveis de HCV mais baixos (Rehermann e Chisari, 2000). Havendo uma relação inversa entre a extensão da resposta CTL no início da infecção e a chance do vírus persistir, cronificando a doença (Chang *et al.*, 1997; Houghton, 2000; Orland *et al.*, 2001).

A pequena quantidade de precursores CTL contra o HCV no sangue periférico é insuficiente para destruir todos os hepatócitos infectados, facilitando a persistência do vírus (Nakamura e Imawari, 2000). Desta forma, a resposta CTL contra o HCV talvez seja muito fraca para clarear o vírus,

porém forte o suficiente para controlar a carga viral, assim como promover a inflamação hepática que após alguns anos poderá evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular (Rehermann e Chisari, 2000; Rehermann *et al.*, 2000).

A persistência do HCV está associada à pressão imune exercida pelo CTL sobre o vírus, a qual selecionará composições genéticas das *quasispecies* do mesmo, promovendo o escape imune precoce nos pacientes crônicos (Weiner *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1997; Orland *et al.*, 2001). Na hepatite crônica, a viremia persiste, apesar da resposta imune celular controlar a replicação do vírus. Nesta situação, o CTL contribuiria na patogênese da doença e as citocinas serviriam de mediadoras da imunopatologia (Koziel *et al.*, 1995; HE *et al.*, 1999).

Alguns autores estudaram indivíduos sadios, anti-HCV soro-negativo, que se expunham freqüentemente ao HCV, ou pela profissão na área da saúde, ou por possuir cônjuge infectado, e observaram que eles possuíam resposta de célula T citotóxica e auxiliadora dirigida principalmente contra a proteína NS3 do HCV no sangue periférico, mesmo na ausência de resposta humoral ou de viremia (Koziel *et al.*, 1997; Rehermann e Chisari, 2000).

Outros admitem haver um período na infecção em que o CTL trabalha conjuntamente com as células NK e CD4 na tentativa de controlar a patologia. Havendo clareamento viral este padrão continua, entretanto se houver a persistência viral, haverá diminuição no número e na função efetora das células em questão (Lechner *et al.*, 2000).

Embora o CTL CD8 seja considerado a célula mais importante para eliminação das células infectadas na infecção pelo HCV, as células T CD4 parecem desempenhar papel central na resposta imune contra o vírus, provavelmente induzindo ou mantendo a atividade citotóxica ou ainda, diretamente, secretando citocinas antivirais (Diepolder *et al.*, 1997).

1.6.3.2.3 Patogenicidade da Resposta Imunológica Celular

1.6.3.2.3.1 Expressão antigênica e *quasispecies* intra-hepáticas do HCV

Há uma grande diferença entre as *quasispecies* virais e, entre as subpopulações de células T do fígado e do sangue periférico. Isto se torna mais importante ao observar-se que em pacientes com hepatite crônica C aproximadamente 5% dos hepatócitos albergam o HCV (Lau *et al.*, 1996).

Enquanto se observa correlação na carga viral de HCV-RNA entre o fígado e o sangue periférico, há diferença qualitativa entre as *quasispecies* do vírus dos dois compartimentos. No fígado, as *quasispecies* apresentam variação na sequência mais semelhante, enquanto no sangue periférico as mutações são silenciosas, outra diferença é que a população viral intra-hepática é mais antiga (Cabot *et al.*, 1997).

A cinética viral no sangue periférico demonstra sobrevida do HCV de apenas quatro horas, sendo o fígado o local mais importante de replicação viral. A maior parte do vírus circulante se deve à reinfeção, e ao rápido *turn-over* das células, e não à liberação das células cronicamente infectadas (Lanford *et al.*, 1995; Zeuzem *et al.*, 1996; Fukumoto *et al.*, 1996).

As diferenças das *quasispecies* de HCV levam à diferenças na qualidade e na apresentação dos antígenos do HCV. Isto é imunologicamente importante, uma vez que a maioria dos linfócitos T é ativada fora do fígado, nos linfonodos, e talvez não possuam o TCR apropriado para reconhecer e eliminar a população de HCV intra-hepática eficientemente (Rehermann e Chisari, 2000; Rehermann *et al.*, 2000).

1.6.3.2.3.2 Infiltrado Inflamatório Intra-Hepático

O fígado normal remove CTL da corrente sangüínea que está sob mecanismo de morte celular ativado (*activation-induced cell death*, AICD), mediado pela ICAM-1, a qual está expressa nas células endoteliais e nas células de kupffer constitutivamente, onde são tolerantes e evoluem para apoptose (Mehal *et al.*, 1999).

Na hepatite crônica pelo HCV, ocorre intensa infiltração linfocitária no fígado, constituída de células ativadas para inflamação e de células de resistência inata. Estes CTL não sofrem expansão clonal no fígado, porém desempenham sua função e morrem em grande quantidade. Talvez para haver a manutenção dos níveis destes linfócitos intra-hepáticos (LIH) seja necessária a migração contínua intra-hepática (Nuti *et al.*, 1998).

Há uma grande diferença entre os linfócitos do fígado e do sangue periférico, no fígado os linfócitos são principalmente células de memória ativadas, que não proliferam no órgão, entretanto tem morte celular programada (PCD). A frequência de CTL contra NS3 do HCV no sangue periférico varia de 0,01-1,2%, enquanto que no fígado é 1-2% , proporção trinta vezes superior (Nakamura e Imawari, 2000). Pelo menos 10% dos

linfócitos intra-hepáticos morrem diariamente e aproximadamente 0,1% do total de linfócitos do organismo migram para o local da inflamação diariamente, tornando o fígado o órgão que mais destrói células T ativadas (Nuti *et al.*, 1998). Isto sugere que uma resposta CTL mais fraca no sangue periférico, associada à evolução crônica, se deva ao contínuo seqüestro de CTL contra o HCV pelo fígado, em decorrência da contínua replicação viral e apresentação antigênica (Missale *et al.*, 1996).

O receptor de célula T (TCR) V β 5.1 é importante na manutenção da inflamação local em resposta ao antígeno HCV, uma vez que se acumula no espaço porta, local onde as reações inflamatórias ocorrem. Esta inflamação decorre da mudança do estado de tolerância do fígado, permitindo aos CTL através da resposta imune, atacar os patógenos hepáticos (HCV) (Mehal *et al.*, 1999).

No fígado de um paciente com HCV, o infiltrado celular ocorre em área de necrose focal ou caseosa (na área peri-portal). A expressão do ICAM-1 e do MHC classe 1 está aumentada nos hepatócitos e células dos ductos biliares, correlacionando-se com a severidade da doença hepática. Os macrófagos estão em maior número nas hepatites pelo HCV mais agressivas, entretanto, os linfócitos são as células mais comuns no fígado infectado pelo HCV. No espaço porta, encontra-se principalmente CD4, enquanto que no lóbulo, CD8. A quantidade de LIH se correlaciona com níveis de ALT e com o grau histológico do fígado, sugerindo que eles promovam lesão hepática (Rehermann e Chisari, 2000).

Os linfócitos induzem a produção de óxido nítrico sintetase, o qual está elevado no fígado dos pacientes com HCV. Os linfócitos CD8 são, na sua maioria, de memória, e expressam Fas, mediador de apoptose, que é regulado próximo do infiltrado inflamatório, às margens da necrose caseosa. Como a inflamação portal/perportal é mais severa quando o Fas está presente, provavelmente ocorrerá apoptose neste local. Os mecanismos de destruição dos hepatócitos pelos CTL são: ligante Fas, TNF- α e perforina. Desta forma, quando CTL secreta INF- γ , ativa o macrófago, este por sua vez secreta TNF- α , que mobilizará células inflamatórias como os neutrófilos para as células endoteliais e fibroblastos (Nakamura e Imawari, 2000).

Os linfócitos CD4 são encontrados principalmente nos folículos linfóides, onde ocorre a apresentação dos antígenos do HCV ao linfócito B. Os CD4 intra-hepáticos secretam principalmente citocinas Th1, as quais estão elevadas na hepatite crônica C, correlacionando-se com a severidade da inflamação e da fibrose hepática (Rehermann e Chisari, 2000).

Os achados mais freqüentes desta patologia hepática são: infiltrado linfocitário portal com plasmócitos; folículos linfóides com centros germinativos; e lesões dos ductos biliares com linfócitos intraepiteliais (Ferrari *et al.*, 1994). A severidade da lesão hepática é determinada pelo vigor da resposta CTL e das células T auxiliaadoras (Nakamura e Imawari, 2000).

1.6.4 Mecanismo de Persistência Viral na Hepatite pelo HCV

O mecanismo que o HCV utiliza para evitar a resposta imune celular e humoral, persistindo e causando hepatite crônica, não é bem conhecido. Há várias hipóteses que tentam explicar este fenômeno (Houghton, 2000; Rehmann e Chisari, 2000).

Uma hipótese é que a resposta imune é qualitativa e/ou quantitativamente insuficiente para destruir as células infectadas em um órgão grande como o fígado. A intensidade da resposta imune celular inicial depende da carga de antígenos, de sinais co-estimulatórios, do tipo de célula apresentadora de antígeno (APC) e na diferenciação e produção de citocinas pelas células T auxiliaadoras (Th). Talvez, cada um destes fatores não esteja em condições ideais na infecção aguda pelo HCV. A carga de antígenos virais depende da replicação do HCV, viremia e conseqüentemente, da expressão das proteínas do HCV. Nos pacientes com hepatite crônica pelo HCV, a apresentação dos antígenos do HCV é pequena, com pequena quantidade de antígeno a proliferação e ativação das células T não são ideais, observando-se pequena quantidade de CTL contra o HCV no sangue periférico. Nas células T efectoras, ocorre uma hierarquia no que tange à concentração de antígenos necessária para estimular uma resposta correspondente. Mesmo uma pequena concentração de antígeno é suficiente para ativar os CTL, entretanto é necessária grande concentração para ativar pelo menos 20-50% de TCR das células T que promoverão a entrada de cálcium, produção de interferon- γ e IL-2. Pequenas doses de antígenos virais podem promover grande

proliferação CTL devido à pequena produção de IL-2. Há alguns mecanismos que podem compensar esta baixa dose de antígenos aumentando a resposta imune anti-viral como: sinais co-estimulatórios, interação CD28-B7 ou ligação de co-receptores CD4, CD8, promovendo o contato entre o complexo MHC-peptídeo e TCR, e aumentando o contato entre TCR e as tirosino-quinases, entretanto talvez não sejam o suficiente na infecção pelo HCV (Rehermann e Chisari, 2000).

Outra hipótese é a variação no genoma viral, devido as *quasespecies* e à grande taxa de mutação do HCV. A resposta imune humoral, assim como os CTL, parecem promover uma pressão de seleção imune sobre HVR-1, selecionando variantes do HCV que escaparão do sistema imune (Farci *et al.*, 1992; Kato *et al.*, 1993; Odeberg *et al.*, 1997; Major *et al.*, 1999; Orland *et al.*, 2001), desta forma, a troca de aminoácidos em epítomos imunodominantes talvez permita ao vírus escapar da resposta imune (Simmonds *et al.*, 1995); mutações na extremidade NH2 da região hipervariável da glicoproteína E2 (HVR gpE2) aparecem precocemente em pacientes que não responderão a anticorpos contra esta região (KATO *et al.*, 1994). O vírus parece regular a expressão das moléculas MHC nas células infectadas escapando desta forma do reconhecimento pelas CTL, isto talvez explique o pequeno número de células T contra o HCV (Rehermann, 2000). Outra variante viral é a que antagoniza a ativação dos CTL, bloqueando a internalização do TCR na APC e impedindo as ligações do TCR necessárias para ativação das células T (Chang *et al.*, 1997). Esta variante pode impedir a resposta imune contra o epítomo selvagem e com

mutação impedindo a proliferação das células T acometidas (Lanzavecchia *et al.*, 1997). Outra variante é uma agonista parcial, que pode diminuir a expressão do TCR impedindo resposta proliferativa ou citotóxica, pode também promover anergia das células T que não conseguirão fazer a transcrição do RNA mensageiro da IL-2 e subsequente secreção da IL-2 após estímulo do TCR, não proliferando (Diepolder *et al.*, 1997; Bertoletti *et al.*, 1994). Este mecanismo pode promover a persistência viral devido a: variação dos epítomos das células T, largo espectro de *quasispecies*, além da anergia. Isto pode enfraquecer a resposta imune dos pacientes, pela ação em epítomos imunodominantes que impediriam o clareamento viral (Muller e Jenkins, 1995; Sloan-Lancaster *et al.*, 1993).

Outra teoria, é que o HCV poderia interferir com o processamento e a apresentação dos antígenos pelos hepatócitos, diminuindo o reconhecimento pelo sistema imune, causando anergia suficiente para promover pequeno grau de inflamação e apoptose, mas não para que o sistema imune destrua todas as células infectadas (Diepolder *et al.*, 1997; Rehermann e Chisari, 2000).

Outro mecanismo que precisa confirmação é a exaustão das CTL pelo excesso de HCV (Moskophidis *et al.*, 1993).

Outra hipótese, é que a presença de proteínas virais na bile, poderia levar à tolerância oral ao HCV, o que pode ser comprovado por observações clínicas de pacientes com colestase severa, que resolveram a infecção, com maior frequência (Weiner *et al.*, 1994).

As citocinas produzidas pelo CTL talvez não consigam proteger o paciente, nem promover o clareamento viral, mas continuam contribuindo ou causando a doença hepática. Quando o vírus é resistente às citocinas produzidas pelos CTL, o clareamento viral depende exclusivamente da destruição dos hepatócitos infectados pela resposta imune. Como a lise direta dos CTL é um processo ineficaz, necessitando contato direto entre as células, caso este seja o único mecanismo para erradicar as células infectadas em um órgão grande como o fígado, poder-se-ia supor que este seja um mecanismo incompleto, levando a destruição de alguns, porém não de todos os hepatócitos infectados (Rehermann e Chisari, 2000).

Finalmente, o HCV poderia interferir ativamente na resposta imune, sequências de proteínas da região estrutural E2 e não estrutural NS5 do HCV inibiriam a ativação da proteino-kinase pelo interferon (Korth *et al.*, 2000).

Infelizmente, não há evidências de imunidade natural em pacientes que conseguiram resolver e curar-se de hepatite aguda pelo HCV, na realidade, há casos documentados de reinfecção em crianças que acabaram evoluindo com hepatite crônica (Lai *et al.*, 1994; Houghton, 2000; Farci *et al.*, 1992).

1.7 Alpha glutathione S transferase

As alpha-glutathione-S-transferases (alpha-GST, EC 2.5.1.18) pertencem a uma classe de enzimas citosólicas que estão distribuídas ubiquamente pelas células em geral e nos hepatócitos em especial. Têm a

função de transportar ânions hepáticos, conjugar a glutathione (GSH) com vários eletrólitos tóxicos e radicais livres para sintetizar prostaglandinas e leucotrienos, desempenhando papel central na proteção das células, além de ativar glutathione peroxidase selênio-independente (Beckett *et al.*, 1987; Boyer, 1989; Hayes *et al.*, 1990; Addya *et al.*, 1994). Também são conhecidas como ligandina ou GST2 e pertencem à classe humana básica das glutathione-S-transferase que promovem a conjugação da glutathione com moléculas hidrofóbicas tóxicas (Beckett *et al.*, 1987).

A alpha GST é uma enzima de baixo peso molecular (PM=50000) presente em grande concentração no fígado, onde representa 3-5% do citosol do hepatócito (3mg/g de tecido hepático seco) (Mannervik, 1985); possui meia vida curta (cerca de 60 minutos) e quando se eleva, seu nível plasmático retorna ao normal em cinco dias (Loguercio *et al.*, 1998). Estudos imunohistoquímicos demonstram distribuição homogênea pelo parênquima hepático (Hiley *et al.*, 1988), região periportal e centro lobular, sendo a última a zona mais segura de desintoxicação de álcool, drogas, hipóxia, assim como as lesões mediadas por vírus (Sherman *et al.*, 1983; Harrison *et al.*, 1990; Trull *et al.*, 1994).

A alanina aminotransferase (ALT) geralmente é utilizada como marcador de lesão hepática, porém possui meia-vida mais longa (48-72hs), retornando aos níveis normais em dez dias após sua elevação, sua distribuição é predominantemente peri-portal, podendo estar normal por um longo período de tempo, embora a lesão histológica já esteja presente ao observarmos a biópsia (Nelson *et al.*, 1995).

Desta forma, a α glutathione parece ser um indicador mais sensível e específico de lesão hepatocelular, principalmente em pacientes com hepatite crônica, quando há comprometimento de lóbulo, assim como das regiões portal e periportal. A α GST tem sido apontada como um indicador sensível de rejeição de enxerto hepático em pacientes submetidos a transplantes de fígado (Dickson *et al.*, 1999; Trull *et al.*, 1992).

A medida de atividade da α GST tem sido proposta como um marcador de lesão hepatocelular mais sensível que as aminotransferases em algumas situações clínicas como:

- Hepatotoxicidade por halotano (Hussey *et al.*, 1986; Hussey *et al.*, 1988);
- Hepatite crônica auto-imune (Hayes *et al.*, 1988);
- Asfixia ao nascimento (Hussey *et al.*, 1986; Beckett *et al.*, 1989);
- Envenenamento por acetaminofeno (Beckett *et al.*, 1985; Beckett *et al.*, 1989).
- Doença hepática por álcool (Harrison *et al.*, 1990).

Alterações nos níveis plasmáticos de α GST podem ser usadas com objetivo clínico para monitorar a variação nos níveis tissulares, como em doenças neoplásicas e não-neoplásicas, nas quais a atividade desta enzima está elevada (Hayes *et al.*, 1988).

A variabilidade das lesões encontradas em pacientes com infecção crônica pelo HCV deve relacionar-se a carga viral, genotipagem e resposta imune do paciente. O mecanismo da lesão, assim como a resposta imune, nestes indivíduos, ainda é desconhecido (Shahara *et al.*, 1996).

A presença de folículos linfóides no parênquima hepático, imunocomplexos circulantes, auto-anticorpos e crioglobulinemia sugerem um mecanismo imunológico na hepatite pelo HCV (Pawlotsky *et al.*, 1995).

A redução dos níveis de glutathione no plasma e nas células mononucleares do sangue periférico, o aumento do ferro e malonaldeído, e a presença de esteatose no parênquima hepático de pacientes com Hepatite crônica pelo HCV sugerem que reações oxidativas podem participar da lesão induzida por este vírus. Isto talvez ocorra pela ação citopática direta do HCV, que ativa a cascata do processo inflamatório (Scheuer *et al.*, 1991; Suarez *et al.*, 1993; Arber *et al.*, 1994; Gerber *et al.*, 1995; Farinati *et al.*, 1995).

A alphaGST regula a síntese de leucotrienos e prostaglandinas, a alphaGST peroxidase e transferase regulam a capacidade de desintoxicação das células, assim como, a resposta imune e inflamatória. A GST afeta a síntese de interleucina2, quando há aumento de radicais livres ocorre síntese de leucotrienos e prostaglandinas produzidas durante a inflamação (Sies, 1988). Nestes pacientes, ocorre elevação plasmática dos níveis de citocinas, havendo uma boa correlação entre o fator de necrose tumoral (alphaTNF) e a atividade histológica (Ramadore *et al.*, 1993; Tilg *et al.*, 1992; Nguyen *et al.*, 1994).

As citocinas influenciam a atividade da alphaGST nos hepatócitos (Kwon *et al.*, 1995), e a alta concentração de alpha-TNF diminui o GSH hepático, causando estresse oxidativo (Morales *et al.*, 1995). Todos estes achados sugerem o possível envolvimento da alphaGST nos hepatócitos de pacientes com infecção crônica pelo HCV.

A associação da medida da alphaGST com a ALT determina um aumento da sua sensibilidade e especificidade em pacientes com hepatite pelo vírus C, uma vez que ALT isoladamente tem sido encontrada em valores normais mesmo quando há lesão hepática confirmada (Vaubourdolle *et al.*, 1994; Vaubourdolle *et al.*, 1995; Vaubourdolle *et al.*, 1996; Loguercio *et al.*, 1998).

Desta forma, a alphaGST tem sido descrita como um importante, sensível e específico marcador de lesão hepática, elevando-se precocemente e auxiliando no monitoramento de pacientes com hepatite pelo HCV, tornando-se um importante marcador precoce de lesão hepática nestes pacientes (Nelson *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1995; Boran e Çetin, 1999; Giannini *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000).

Alguns autores, entretanto, após analisar a atividade da alpha-GST em crianças portadoras da infecção pelo HCV, concluíram que não havia correlação desta enzima com lesão celular hepática (Namour *et al.*, 1999). Outros consideraram que a alpha-GST não era um marcador de inflamação hepática útil em pacientes com hepatite crônica pelo HCV (Thorburn *et al.*, 1996).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1- Realizar a comparação em pacientes com hepatite pelo vírus C entre a atividade enzimática da alpha-GST com as demais enzimas: Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST) e Gama glutamiltransferase (GGT);

2- Correlação entre a atividade enzimática da alpha-GST e das demais enzimas classicamente utilizadas, para avaliar lesão hepática com as alterações histológicas da biópsia hepática, em pacientes com hepatite pelo vírus C.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

Em uma amostra de pacientes com infecção crônica pelo HCV, realizou-se estudo tipo transversal com inclusão prospectiva de pacientes, nos quais: o grau de desarranjo estrutural hepático e as enzimas ALT, AST e GGT foram comparados à atividade enzimática da alpha-GST.

3.2 Casuística

Após a aprovação pelo comitê de ética do HC-FMUSP, e consentimento explícito de todos os pacientes, foram elegíveis para participar deste estudo 114 pacientes com infecção crônica pelo HCV, atendidos no Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP, no período compreendido entre abril 2000 e novembro de 2001. Os pacientes foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão:

3.2.1 Critérios de inclusão no grupo

- Anti-HCV positivo
- HCV-RNA positivo
- Ambos os gêneros
- Idade entre 18 e 70 anos
- Consentimento informado e concordância assinada para avaliação clínica e laboratorial e para realização da biópsia hepática.

3.2.2 Critérios de exclusão no grupo

- Co-infecção com HBV
- Co-infecção com HIV
- Tratamento atual ou pregresso para hepatite C
- Consumo de álcool superior a 40g etanol/dia
- Uso de drogas imunossupressoras
- Insuficiência Renal crônica em atividade

Foi utilizado um grupo controle com 66 indivíduos sadios (doadores de sangue), para determinar o valor de referência da α GST em nosso meio.

Em todos os pacientes a serem estudados, os testes bioquímicos para a avaliação da lesão hepática foram: ALT, AST e γ GT.

3.3 Método

3.3.1 Caracterização da Infecção pelo vírus C

O diagnóstico de infecção pelo vírus da hepatite C foi estabelecido, quando havia suspeita clínica, bioquímica, sorológica (anti-HCV) e molecular (HCV-RNA). Doença em atividade foi estabelecida, quando havia comprovação clínica, bioquímica, sorológica, molecular e biópsia hepática em indivíduo portador de vírus C.

3.3.2 Variáveis Analisadas

3.3.2.1 Epidemiológicas

As seguintes informações foram obtidas através de entrevista com os pacientes:

- Gênero
- Idade

3.3.2.2 Laboratoriais

3.3.2.2.1 Coleta de amostras

Todas as amostras de sangue foram colhidas em tubos à vácuo com heparina e, sem anticoagulante, obtidas por venopunção em veia cubital, em coleta matinal.

A separação do material ocorreu em até 01 (uma) hora após a coleta. O soro foi utilizado para determinação da ALT, AST e γ GT por método

bioquímico padronizado (autoanalisador Cobas Integra, Roche Diagnostics®). O plasma foi congelado e armazenado a -70° C para a determinação da atividade da alphaGST posteriormente (ELISA Hepkit®; Biotrin International, Dublin, Ireland).

3.3.2.2 Avaliação Bioquímica

Todas as amostras de sangue foram colhidas num intervalo máximo de até seis meses da biópsia hepática, com os pacientes em jejum de no mínimo oito horas. As amostras obtidas por venopunção a vácuo, foram colhidas em tubos estéreis com e sem anticoagulante. A separação do material após a centrifugação ocorreu em até uma hora após a coleta. Parte do soro foi congelada e armazenada a -70°C.

As análises foram realizadas no DLC e nos LIMs 03 e 47 do HCFMUSP.

Alanina-aminotransferase (ALT): analisada por métodos cinéticos adaptados para analisadores bioquímicos automatizados, em equipamento Cobas-Integra (Roche Diagnostics®), com reagentes Roche®, no Serviço de Bioquímica da DLC/LIM 03 do HCFMUSP. Valores de referência (VR) a 37° C: sexo masculino 10 - 34U/L, sexo feminino 10 - 30U/L.

Aspartato-aminotransferase (AST): analisada por métodos cinéticos adaptados para analisadores bioquímicos automatizados, em equipamento Cobas-Integra (Roche Diagnostics®), com reagentes Roche®, no Serviço de Bioquímica da DLC/LIM 03 do HCFMUSP. Valores de referência (VR) a 37° C: sexo masculino 10 - 44 U/L, sexo feminino 10-36U/L.

Gama glutamil transferase (GGT): analisada por métodos cinéticos adaptados para analisadores bioquímicos automatizados, em equipamento Cobas-Integra (Roche Diagnostics®), com reagentes Roche®, no Serviço de Bioquímica da DLC/LIM 03 do HCFMUSP. Valores de referência (VR) a 37° C: sexo masculino 11 - 55U/L, sexo feminino 7 - 32U/L.

Alpha GST: a atividade da alpha GST foi medida em duplicata por imunoensaio, baseado no princípio de enzimaímunoensaio do tipo sanduíche (Hepkit-Alpha-Biotech, Biotrin International®, Dublin, Ireland), com leitura espectrofotométrica em leitora de ELISA automatizada no setor de Imunologia DLC/LIM 03 do HCFMUSP.

3.3.2.2.3 Testes moleculares e sorológicos

A metodologia utilizada para determinar o teste anti-HVC foi enzimaímunoensaio, de 3° geração (Abbott Laboratories®, Axin), o resultado foi expresso como positivo ou negativo e realizado no setor de Imunologia DLC/LIM 03 do HCFMUSP.

A pesquisa do HCV-RNA foi feita pela reação de polimerase em cadeia (PCR) "*in house*" utilizando "*primers*" da região 5' UTR altamente conservada, o resultado foi expresso como reagente ou não reagente, realizado no Lim 47 - Laboratório de Investigação Médica em Hepatites do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

3.3.4 Histológicas

Foi realizada biópsia hepática em 97 (noventa e sete) pacientes em até 6 (seis) meses da coleta de sangue.

Os critérios para indicação da biópsia hepática foram os adotados na Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HCFMUSP, isto é, indivíduos com testes de anti-HCV e HCV-RNA reagentes, independentemente do valor da ALT. Foram contra indicações para a realização do procedimento, atividade de protrombina <50%, plaquetas <50.000/mm³, hemoglobina <8,0 g/dl e presença de ascite.

Os fragmentos de tecido hepático obtidos através de biópsia percutânea com agulha Tru-cut®, foram fixados em solução de formol a 10%, e posteriormente submetidos à desidratação com álcool etílico e à diafanização em banhos de xilol. Em seguida, procedeu-se a inclusão do material em blocos de parafina. Em micrótomo convencional, obtiveram-se cortes histológicos de 4 a 5 micrômetros de espessura, que foram corados pela hematoxilina-eosina, tricrômio de Masson, azul da Prússia (método de Perls) e impregnação das fibras reticulares pela prata (método de Gomory).

Todas as lâminas de biópsia hepática foram analisadas por patologista que avaliou a atividade necroinflamatória portal/periportal (APP) e lobular (AL) e o estadiamento (E).

A análise da APP, AL e do E se baseou nos critérios semi-quantitativos propostos por Gayoto et al., em 2000, para a classificação das hepatites crônicas, conforme:

1- Alterações Estruturais

A análise do estadiamento baseou-se no grau de fibrose e na extensão do comprometimento da arquitetura lobular:

0. Arquitetura lobular normal;
1. Expansão fibrosa de espaço porta;
2. Expansão fibrosa portal, com septos porta-porta;
3. Preservação apenas parcial da arquitetura lobular, com septos porta-porta e porta-centro, podendo ser vistos esboços de nódulos;
4. Cirrose plenamente identificada à biópsia ou predomínio de áreas nodulares em relação a lóbulos remanescentes.

Para análise estatística, as três primeiras categorias (0,1 e 2) foram agrupadas e categorizadas como “baixo grau de estadiamento” e as outras duas (3 e 4) como “alto grau de estadiamento”.

2- Infiltrado Inflamatório Portal/Septal

Classificados de 0 a 4, independentemente da formação de folículos linfóides, como:

0. Raros linfócitos portais;
1. Aumento discreto do número de linfócitos portais;
2. Aumento moderado do número de linfócitos portais;
3. Aumento acentuado do número de linfócitos portais;
4. Aumento muito acentuado do número de linfócitos portais;

Para análise estatística, as três primeiras categorias (0,1 e 2) foram agrupadas e categorizadas como “baixo grau de Inflamação Portal/Septal” e a outras duas (3 e 4) como “alto grau de Inflamação Portal/Septal”.

3- Atividade Periportal/Perisseptal

A APP foi graduada de acordo com a intensidade do processo inflamatório portal e a presença de necrose em saca-bocado:

0. Ausência de lesões da interface espaço-porta/parênquima;
1. Extravasamento de linfócitos para interface (spill over), não caracterizando a presença de necrose em saca-bocado;
2. Necrose em saca-bocados discreta (pequenas áreas em poucos espaços- porta);
3. Necrose em saca-bocados moderada (extensas áreas em poucos espaços- porta ou pequenos focos em muitos espaços-porta);
4. Necrose em saca-bocados em extensas áreas de muitos espaços-porta;

Para análise estatística, as três primeiras categorias foram agrupadas e categorizadas como “atividade necroinflamatória portal e peri-portal leve” e as outras duas como “atividade necroinflamatória portal e peri-portal intensa”.

4- Atividade Parenquimatosa

A AP também foi graduada de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório lobular e/ou presença de necrose de forma que:

0. Hepatócitos normais, isoformos;
1. Alterações discretas de hepatócitos, incluindo tumefação ou retração acidofílica, eventualmente acompanhada de infiltrado linfo-histiocitário e raros focos de necrose;
2. Necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios;

3. Necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários em muitos sítios, associada a áreas limitadas de necrose confluyente;
4. Necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios; associada à necrose confluyente extensa/múltipla;

Para análise estatística, as três primeiras categorias foram agrupadas e categorizadas como “atividade necroinflamatória focal leve” e as outras duas como “atividade necroinflamatória focal intensa”.

3.4 Análise da α -Glutathione-S-Transferase

Para o estudo da relação entre níveis de α GST e as variáveis de interesse, as análises foram realizadas em duas fases.

Primeira: para avaliar o valor de referência da α GST, nós dividimos os indivíduos em 2 (dois) grupos:

- Sessenta e seis indivíduos sadios.
- Cento e quatorze portadores de hepatite pelo vírus C, selecionados entre aqueles atendidos no ambulatório de hepatite pelo HCV, da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do complexo HC - FMUSP.

Segunda: no grupo de portadores de hepatite pelo vírus C comparamos as concentrações séricas de α GST, ALT, AST e γ GT com a histologia hepática.

O grupo dos indivíduos sadios é constituído por doadores de sangue que não apresentam história, sinais ou quadro laboratorial de hepatopatias, são HIV negativos, sendo excluídos usuários de drogas e etilistas (com ingestão de etanol maior de 40g/dia).

3.4.1 Descrição do método

1 Calibração e incubação da amostra

1.1 Preparo da solução de lavagem

1.1.1 Preparar diluição do concentrado de lavagem de 1/20, por exemplo, 10 mL de concentrado de lavagem para 190mL de água deionizada. Preparar somente o volume necessário para o ensaio. Cuidado para que os cristais salinos estejam dissolvidos antes da diluição.

1.2 Preparo dos calibradores

1.2.1 Preparar 40µg/L de calibrador da solução estoque de αGST: estoque 25µL + solução de lavagem 2500 µL Total = 2525 µL @ 40µg/L.

1.3 Preparo das amostras

1.3.1 Imediatamente antes de iniciar o ensaio, diluir as amostras 1/5, diluindo 50µL da amostra com 200µL de solução de lavagem. O controle positivo não precisa diluir.

1.4 Colocar os poços de trabalho na placa. Arrumar em colunas de oito com calibradores, controle positivo e amostras diluídas em duplicata na placa de ELISA.

1.5 Cobrir a placa de ensaio e incubar a 20-25°C por 60 ± 2 minutos com agitação uniforme.

2 Incubação do conjugado

2.1 Após 55 minutos preparar o conjugado.

2.2 Preparo do conjugado

2.2.1 Imediatamente antes de iniciar o ensaio, diluir o conjugado concentrado 1/51, adicionando 20 μ L do conjugado em 1mL de solução de lavagem por tira.

2.3 Remover a cobertura e lavar cada tira 4 vezes com solução de lavagem (250 μ L-350 μ L/poço). Quando acabar bater a placa contra um papel toalha até secar completamente os poços.

2.4 Adicionar 100 μ L de conjugado em cada poço.

2.5 Cobrir novamente a placa e incubar a 20-25°C por 30 $\pm$ 2 minutos com agitação uniforme.

2.6 Lavar cada tira como no passo 2.3

3. Desenvolvimento de cor

3.1 Adicionar 100 μ L de substrato em cada poço utilizando pipeta multicanal e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos exatos.

4. Parada

4.1 Adicionar 100 μ L de solução de parada em cada poço. Misturar a solução de parada com o substrato.

4.2 Ler imediatamente a 450nm usando 630nm como referência.

5. Cálculo do resultado

5.1 Calcular a média das absorvâncias de cada amostra e controle.

5.2 Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.

5.3 O controle positivo não se multiplica pelo fator.

3.5 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram representadas por média, desvio padrão e intervalo de confiança.

As variáveis qualitativas foram representadas por frequência absoluta (n) e relativa (%). Para análise da relação entre níveis de α GST e as variáveis categóricas de interesse, foram utilizados o teste do Qui-quadrado (χ^2) ou G teste quando recomendado. Foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney (U test), para comparar as variáveis quantitativas.

Foram determinados: sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), razão de verossimilhança positiva (RVP), razão de verossimilhança negativa (RVN) e acurácia da α GST, ALT, AST e γ GT, quando comparados às variáveis histológicas analisadas na biópsia hepática.

Utilizou-se a curva ROC (receiver operator characteristic), para identificar o melhor valor de α GST, para determinar a normalidade e para detectar lesão histológica mais agressiva.

Foi adotado o nível de significância de 0,05 ($\alpha = 5\%$). Níveis descritivos (p) inferiores a este foram considerados significantes.

Para análise estatística, utilizou-se o programa BioEstat versão 3.0

RESULTADO

RESULTADO

No período compreendido entre abril de 2000 e novembro de 2001, foram avaliados pacientes atendidos no Ambulatório da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP e considerados elegíveis para participar deste estudo 114 pacientes com infecção crônica pelo HCV que preenchiam os critérios de inclusão estabelecidos para este trabalho. A maior parte das exclusões foi motivada por se tratarem de pacientes em tratamento ou previamente tratados ou por serem portadores de insuficiência renal crônica.

4.1 Análise descritiva

4.1.1 Características gerais da amostra

Para avaliar o valor de referência da α GST, nós dividimos os indivíduos em 2 (dois) grupos:

Grupo controle: sessenta e seis indivíduos sadios, doadores de sangue.

Grupo de pacientes: cento e quatorze portadores de hepatite pelo vírus C.

A Tabela 1 resume as características demográficas e os níveis de α GST encontrados nos dois grupos.

Tabela 1: Características gerais da amostra

Características gerais	Controles (n=66)	Pacientes (n=114)	p
Idade; média, (desvio padrão)	31,06 (9,48)	37,79 (11,78)	ns ¹
Sexo masculino; n, (%)	35 (53,02)	59 (51,75)	ns ¹
α GST; média, (desvio padrão)	3,49 (1,16)	8,79 (13,89)	p<0,01 ²
α GST ≥ 4 ; n, (%)	5 (7,57)	98 (85,96)	p<0,01 ³

¹ não significante; ² teste de Mann-Whitney; ³ teste χ^2

4.1.2 Avaliação Bioquímica

A Tabela 2 mostra os valores dos parâmetros bioquímicos verificados entre os 114 pacientes portadores de Hepatite C. Apresentaram ALT acima dos valores normais, 86 pacientes (75,44%); AST acima dos valores normais, 50 pacientes (43,86%) e; γ GT acima dos valores normais, 50 pacientes (43,86%).

Tabela 2: Valores de média e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos observados (N=114)

Parâmetros bioquímicos	Média	Desvio padrão
ALT	68,76	84,64
AST	50,37	67,44
γ GT	62,05	60,31

ALT Alanina aminotransferase, AST Aspartato amino transferase, γ GT Gama glutamil transferase.

4.1.3 Avaliação Histológica

Dos 114 pacientes estudados, 97 foram submetidos à biópsia hepática. Em 1 destes pacientes, o fragmento de biópsia foi inadequado à análise do estadiamento. A Tabela 3 mostra a distribuição dos pacientes conforme os graus das diversas variáveis histológicas estudadas.

Da tabela verifica-se que em relação à alteração arquitetural 11 pacientes (11,46%) apresentavam graus mais avançados (3 e 4) de fibrose; .23 (24,46%) grau três e quatro de infiltrado inflamatório portal/septal e 12 (12,37%) grau três na atividade necroinflamatória periportal/septal (APPS), sendo que nenhum foi classificado como grau quatro.

Já com relação à atividade parenquimatosa, a quase totalidade (95,88%) dos pacientes apresentava lesões de baixo grau ou ausência das mesmas.

Tabela 3: Distribuição das alterações histológicas

Alteração histológica (Graus)	N	%
Alteração estrutural		
0	20	20,83
1	47	48,96
2	18	18,75
3	8	8,33
4	3	3,13
Sub-total	96	100
Infiltrado inflamatório portal/septal		
0	1	1,06
1	21	22,34
2	49	52,14
3	22	23,40
4	1	1,06
Sub-total	94	100
Atividade periportal/perisseptal		
0	25	25,77
1	17	17,53
2	43	44,33
3	12	12,37
4	0	0
Sub-total	97	100
Atividade parenquimatosa		
0	3	3,09
1	51	52,58
2	39	40,21
3	3	3,09
4	1	1,03
Sub-total	97	100

4.1.4 Determinação do valor de corte normal da α GST

Utilizou-se a curva ROC (receiver operator characteristic) para identificação do melhor ponto de corte da α GST, para determinar a normalidade do teste (Figura 2). Valores inferiores a 4,00 $\mu\text{g/dL}$ (Sensibilidade = 86% e Especificidade = 92%) foram considerados normais.

Figura 2: Sensibilidade e especificidade da α GST na determinação do valor normal para o teste.

4.1.5 Resultados da α GST nos grupos doente e normal

A Tabela 4 resume os resultados da determinação das concentrações séricas da α GST entre os grupos doente e normal, utilizando-se o ponto de corte determinado (4,00 $\mu\text{g/dL}$).

Observou-se que houve associação estatisticamente significativa entre os níveis alterados de α GST e ALT ou AST ($p < 0,05$) entre os portadores do vírus C, mas não houve associação significativa entre α GST e características demográficas (idade ou sexo) e o γ GT.

Tabela 4: Resultados da α GST nos grupos de pacientes e controle.

	Controle (66)	Pacientes (114)	p
Freqüência de α GST $\geq 4,00$ μ g/dL	5 (7,57%)	98 (85,96%)	<0,01
Valor observado (Média $\pm$ DP)	3,49 $\pm$ 1,16	8,79 $\pm$ 13,89	<0,01

DP: Desvio Padrão

4.1.6 Determinação da concentração de α GST indicadora de lesão hepática

Utilizou-se novamente a curva ROC para identificação do melhor ponto de corte da α GST para determinar lesão histológica hepática mais agressiva.

Figura 3: Sensibilidade e especificidade da α GST na determinação de lesão histológica hepática mais agressiva

O valor de 8,00 μ g/dL (Sensibilidade = 50% e Especificidade = 84%) foi considerado o melhor corte para indicar lesão histológica hepática mais agressiva (Figura 3), porém com poder de discriminação inferior ao do corte estabelecido para normalidade (Figura 2).

4.1.7 Análise das enzimas hepáticas (α GST, ALT, AST e γ GT) em relação à histologia hepática

Foram comparadas as alterações histológicas avaliadas à biópsia hepática com os níveis séricos de α GST, ALT, AST e γ GT entre os pacientes com hepatite pelo HCV e determinadas as respectivas sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), razão de verossimilhança positiva (RVP), razão de verossimilhança negativa (RVN) e acurácia de cada enzima como preditoras de alterações histológicas de maior grau (Tabela 5).

A ALT apresentou a melhor sensibilidade dentre em todas as variáveis analisadas enquanto que a α GST ($\geq 8,00 \mu\text{g/dL}$) demonstrou a melhor especificidade para determinar lesão histológica hepática mais agressiva. A α GST ($\geq 8,00 \mu\text{g/dL}$) também apresentou os melhores VPP e RVP para determinar atividade parenquimatosa e infiltrado inflamatório mais agressivo. Comparando-se as concentrações séricas das enzimas hepáticas com as alterações histológicas, observou-se que a α GST ($\geq 8,00 \mu\text{g/dL}$) apresentou associação estatisticamente significativa com infiltrado inflamatório portal/septal mais avançado, assim como as aminotransferases (Tabela 5).

Tabela 5: Análise comparativa das variáveis analisadas na biópsia hepática com as enzimas

	Qui- quadrado (p-valor)	Sensibilid ade (%)	Especifi cidade (%)	Valor Preditivo Positivo (%)	Valor Preditivo Negativo (%)	Acuracia (%)	Razão de Verossimi lhança Positiva	Razão de Verossimi lhança Negativa
AE *								
ALT	0.4121	90.91	24.71	13.51	95.46	32.29	1.21	0.37
AST	0.2777	63.64	58.82	16.67	92.59	59.38	1.55	0.62
GGT	0.0701	72.73	61.18	19.51	94.55	62.50	1.87	0.45
αGST(4)	0.9241	90.91	15.29	12.20	92.86	23.96	1.07	0.59
αGST(8)	0.7746	27.27	71.76	11.11	88.41	66.67	0.97	1.01
AP **								
ALT	0.5648	100.00	24.73	5.41	100.00	27.87	1.33	0.00
AST	0.0595	100.00	59.14	9.52	100.00	60.82	2.45	0.00
GGT	0.4308	75.00	58.06	7.14	98.18	58.76	1.79	0.43
αGST (4)	0.9089	100.00	15.05	4.82	100.00	18.56	1.18	0.00
αGST (8)	0.1394	75.00	74.19	11.11	98.57	74.23	2.91	0.34
IIPS ***								
ALT	0.0155	95.65	29.58	3.56	95.45	45.74	1.36	0.15
AST	0.0226	65.22	64.79	37.50	85.19	64.89	1.85	0.54
GGT	0.4737	52.17	59.15	29.27	79.25	57.45	1.28	0.81
αGST (4)	0.1626	95.65	18.31	27.50	92.86	37.23	1.17	0.24
αGST (8)	0.0015	56.52	81.69	50.00	85.29	75.53	3.09	0.53
APPPS ****								
ALT	0.0496	100.00	27.06	16.22	100.00	36.08	1.37	0.00
AST	0.0067	83.33	62.35	23.31	96.36	64.95	2.21	0.27
GGT	0.0067	83.33	62.35	23.81	96.36	64.95	2.21	0.27
αGST (4)	0.22	100.00	16.47	14.46	100.00	26.80	1.20	0.00
αGST (8)	0.4366	41.67	74.12	18.52	90.00	70.10	1.61	0.79

*Alteração Estrutural; **Atividade Parenquimatosa; I*** Infiltrado Inflamatório Portal/Septal; ****Atividade Periportal/Periseptal

ALT Alanina aminotransferase, AST Aspartato amino transferase, γGT Gama glutamyl transferase, αGST Alpha Glutathione S Transferase

Finalmente, nossos resultados também evidenciaram associação significativa entre níveis de αGST ≥8,00 µg/dL com: ALT e AST alteradas e IIPS (p<0,05).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A Hepatite pelo vírus C é um importante problema de saúde pública mundial, acredita-se que 3% da população esteja acometida por esta patologia. A determinação dos níveis da atividade de diversas enzimas sintetizadas no fígado tem sido utilizada na avaliação de portadores de Hepatite pelo HCV. Dentre estas, estudamos a α GST, que tem sido proposta como um marcador de lesão hepatocelular em diversas situações clínicas (Hussey *et al.*, 1986; Hussey *et al.*, 1988; Beckett *et al.*, 1989; Harrison *et al.*, 1990), e em especial na Hepatite pelo HCV (Nelson *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1995; Boran e Çetin, 1999; Giannini *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000).

Em pacientes infectados com vírus da hepatite C, a secreção ativa de citocinas, fator de necrose tumoral (TNF) e anticorpos anti-HCV pelos linfócitos do sangue periférico reflete a interação do sistema imune com antígenos do vírus C e parece estar relacionada à disfunção hepática (Ducos *et al.*, 1994).

As citocinas influenciam a atividade da α GST nos hepatócitos (Kwon *et al.*, 1995). A elevada concentração de α TNF diminui o GSH hepático, causando estresse oxidativo (Morales *et al.*, 1995). Estes achados sugerem o possível envolvimento da α GST na alteração hepatocítica de pacientes com infecção pelo HCV. Assim, a interpretação das alterações desta

enzima, torna-se imprescindível, não só nas diversas formas de doença hepática, como também na infecção pelo HCV.

A biópsia hepática é o “*gold standard*” e única forma de identificar as alterações histológicas que marcam as diferentes fases da infecção pelo HCV. Entretanto, por ser um procedimento invasivo, associa-se, não raramente, a complicações (Hiley *et al.*, 1988) e por isto não pode ser repetida com a frequência desejada, o que permitiria avaliação continuada do parênquima hepático. Além das complicações inerentes ao método, podem ocorrer erros de amostragem, no sentido de se obterem fragmentos de tecido hepático não representativos de todo o parênquima.

Conseqüentemente, um marcador bioquímico não invasivo, sensível e específico é necessário para diagnóstico e acompanhamento de lesão hepática em pacientes com infecção pelo HCV.

Foram elegíveis, para participar deste estudo, 114 pacientes com infecção pelo HCV atendidos no Ambulatório da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HCFMUSP. Para tanto, analisou-se a associação dos níveis de atividade enzimática da α GST com variáveis bioquímicas (ALT, AST e γ GT) e histológicas (biópsia hepática).

Analisando as características da população estudada, observou-se predomínio do sexo masculino (52%). O resultado encontrado reflete as características da população estudada, na qual encontramos grande número de indivíduos provenientes de bancos de sangue, cujos voluntários são, em sua maioria, do gênero masculino. Além disto, sabe-se que este gênero é também maioria entre usuários de drogas ilícitas e aqueles com

vida sexual promíscua (Conry e Cantinlena *et al.*, 1996). Outros autores já demonstraram um predomínio do sexo masculino sobre o feminino em pacientes com infecção pelo HCV, entretanto, as prevalências foram mais altas, 64% (Graf *et al.*, 1996), 69% (Merican *et al.*, 1993), 71% (Van Thiel *et al.*, 1995) e 72% (Delladetsima *et al.*, 1996), taxas superiores às verificadas neste estudo.

A média da idade e o desvio padrão dos pacientes incluídos neste estudo foram 37.79 +/- 11.78 anos, caracterizando uma população de pacientes jovens. Idades semelhantes foram observadas por Delladetsima *et al.*, em 1996, com média de idade de $37,8 \pm 12,8$ anos, ao analisarem 170 indivíduos infectados com infecção pelo HCV. O estudo de Poynard *et al.*, em 1997, sobre história natural de hepatite C mostrou média de 45,6 anos entre os 2235 pacientes estudados.

A análise dos parâmetros bioquímicos mostrou níveis séricos de ALT acima do limite superior da normalidade em 86 (75,4%) dos pacientes; achados semelhantes aos de Boyer e Marcellin, em estudo de 2000.

Os níveis séricos de AST também se mostraram alterados, entretanto, em menor número de pacientes 50 (43,86%) e com valores médios menores que os da ALT. A média da ALT foi de 2,0 x LSN, enquanto que o da AST foi de 1,1 x LSN sendo este perfil bioquímico típico da infecção pelo HCV em fases iniciais ou intermediárias.

Os níveis séricos de γ GT estavam elevados em 50 pacientes (43,86%) com média de 1,12 x LSN. Achado semelhante foi encontrado por Silva, em 1999, 47,7%. A elevação da γ GT nos pacientes estudados não

poderia ser explicada pelo alcoolismo, já que este foi considerado critério de exclusão deste estudo. Giannini et al., em 2001, ao analisarem 60 pacientes com hepatite pelo vírus C, consideraram freqüente o achado de γ GT acima do LSN. Hwang et al., em 2000, também encontraram elevada prevalência de γ GT acima LSN entre os portadores do HCV.

A análise dos parâmetros histológicos revelou que 18,55 % dos pacientes apresentavam fígado reacional, 78,33% hepatite crônica e 3,12 % cirrose. O maior número de pacientes com lesão hepática na fase inicial ou intermediária está de acordo com as características encontradas por outros autores (Granero, 1999; Poynard *et al.*, 2001). Granero, em 1999, ao analisar 254 portadores do HCV, verificou que 63,4% apresentavam estágios iniciais de lesão hepática e 12,6% cirrose. Poynard et al., em 2001, obtiveram resultados semelhantes ao analisarem 377 portadores de hepatite pelo HCV, 82% dos pacientes com graus iniciais de fibrose e 10% com cirrose.

Os achados histológicos deste trabalho revelaram que a maioria dos pacientes apresentava algum grau de hepatite crônica, predominando as formas leves, com graus menos intensos de atividade necroinflamatória periportal/periseptal e lobular, baixos graus de fibrose hepática e de infiltrado inflamatório portal/septal, caracterizando a infecção crônica pelo HCV, entre os pacientes estudados, como uma doença hepática pouco agressiva, ou de tempo de doença relativamente curto.

A análise da atividade necroinflamatória periportal/perisseptal revelou que dos 97 pacientes com biópsia representativa, 85 (87,62%) apresentavam graus 0,1 e 2 de APPPS. Poynard et al, em 2001, observaram que 66% dos

377 portadores de infecção crônica pelo HCV apresentavam graus iniciais de inflamação, enquanto que Granero, em 1999, ao estudar 254 indivíduos, encontrou 67% com atividade necro-infamatória discreta. O achado de uma maior prevalência de pacientes acometidos com graus de APPPS mais leve também parece sugerir doença menos agressiva ou de curso mais curto.

Quanto à atividade necroinflamatória lobular, observou-se predomínio de graus menos intensos de atividade (0,1 e 2) em 93 (95,87%) dos pacientes, o que está de acordo com o estudo de Graf et al., em 1996, que encontraram atividade lobular discreta em 97% dos 163 pacientes com hepatite crônica pelo HCV. Granero et al., em 1999, analisando 254 biópsias de pacientes anti-HCV positivos, encontrou atividade necroinflamatória lobular de graus 1 ou 2 em 94,5% e graus 3 ou 4 em somente 3,9% das biópsias.

Neste estudo, a maioria dos pacientes (88,54%) apresentava graus menos intensos de alteração da arquitetura estrutural (0,1 e 2) e apenas 3,12% apresentavam cirrose à biópsia. Delladetsima et al., em 1996, encontraram em 170 biópsias hepáticas de pacientes com hepatite crônica pelo HCV, a presença de fibrose em graus menos intensos em 81,2% e cirrose em 14,1 % dos casos.

Gráus menos intensos de infiltrado inflamatório portal/septal foram encontrados em 75,53% dos pacientes.

Na amostra de pacientes com as características acima descritas, várias observações foram detectadas.

O nível de 4 $\mu\text{g/dL}$ αGST mostrou a melhor sensibilidade 85,96% e especificidade 92,42% para determinar a normalidade do teste, assim como

associação estatisticamente significativa com alteração de ALT ou AST ($p < 0,05$).

Observou-se também que $\alpha\text{GST} \geq 8 \text{ } \mu\text{g/dL}$ mostrou a melhor especificidade para determinar lesão histológica hepática mais agressiva (graus 3 e 4), assim como a melhor especificidade, valor preditivo positivo e razão de verossimilhança positiva para: inflamação portal e atividade parenquimatosa mais agressiva.

Encontrou-se também associação estatisticamente significativa entre $\alpha\text{GST} \geq 8 \text{ } \mu\text{g/dL}$ e inflamação portal mais agressiva ($p < 0,05$).

A αGST poderia ser utilizada em pacientes com Hepatite pelo HCV com ALT elevada, como um indicador complementar de lesão histopatológica mais agressiva.

Embora os níveis de αGST sejam mais específicos que outros testes bioquímicos (ALT, AST e GGT) no diagnóstico de lesão histológica hepática mais agressiva, eles não possuem sensibilidade e valor preditivo suficiente, para evitar a necessidade da realização da biópsia hepática.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Há associação estatisticamente significativa entre alteração de α GST e ALT ou AST ($p < 0,05$).
2. Valor de 4 $\mu\text{g/dL}$ α GST mostrou a melhor sensibilidade 85,96% e especificidade 92,42% para determinar a normalidade do teste.
3. Valores de α GST $\geq 8 \mu\text{g/dL}$ mostraram a melhor especificidade para determinar lesão histológica hepática mais agressiva (graus 3 e 4), com melhor valor preditivo positivo e razão de verossimilhança positiva para:
 1. Inflamação portal.
 2. Atividade parenquimatosa mais agressiva.
4. Há associação estatisticamente significativa entre α GST $\geq 8 \mu\text{g/dL}$ e inflamação portal mais agressiva ($p < 0,05$).
5. Embora os níveis de α GST sejam mais específicos que outros testes bioquímicos (ALT, AST e GGT) no diagnóstico de lesão histológica hepática mais agressiva, eles não possuem sensibilidade e valor preditivo suficiente, para evitar a necessidade da realização da biópsia hepática.
6. A α GST poderia ser utilizada em pacientes com Hepatite pelo HCV com ALT elevada, como um indicador complementar de lesão histopatológica mais agressiva.

ANEXOS

ANEXOS**Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido**

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS -INFORMAÇÃO

(Instruções para preenchimento no verso)

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M () F ()

DATA NASCIMENTO: / /

ENDEREÇO: Nº

APTO:

BAIRRO:

CIDADE

CEP:

TELEFONE: DDD ()

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M () F ()

DATA NASCIMENTO: / /

ENDEREÇO: Nº

APTO:

BAIRRO:

CIDADE:

CEP:

TELEFONE: DDD ()

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA**

ALPHA GLUTATIONA S TRANSFERASE : VALIDAÇÃO METODOLÓGICA E
O SEU SIGNIFICADO CLÍNICO COMO MARCADOR DE LESÃO HEPÁTICA
EM PACIENTES COM HEPATITE CRÔNICA PELO VÍRUS C

2. PESQUISADOR: EVANDRO ANTÔNIO BENTES DE OLIVEIRA JÚNIOR**CARGO/FUNÇÃO: PÓS – GRADUANDO****INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRM-PA 4543****UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA****3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**

SEM RISCO (X) RISCO MÍNIMO ()

RISCO MÉDIO ()

RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência
imediate ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 ANOS

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ;
Estabelecer a validação metodológica e o significado clínico da alphaGST como marcador de lesão hepática em pacientes com Hepatite Crônica pelo Vírus C.
Objetivos:* Caracterizar a medida da atividade enzimática da alpha glutathione S transferase;* analisar o desempenho do novo método em indivíduos sadios e em pacientes com hepatite pelo vírus C;* realizar a comparação nos indivíduos analisados entre atividades enzimáticas da alphaGST com demais enzimas ALT, Aspartato aminotransferase (AST) e Gama glutamiltransferase (GGT) ;* correlação anátomo-clínica da atividade enzimática da alphaGST com: ALT, AST e GGT.

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais;
Será obtida amostra de sangue por venoclise em sistema "Vacutainer" para a determinação da atividade enzimática da Alanina Aminotransferase, Aspartato Aminotransferase, Gama GT e Alpha glutathione S transferase através de técnicas imunoenzimáticas.

3. desconfortos e riscos esperados;
Desconforto provocado pela picada da agulha na pele no momento da obtenção da amostra de sangue. Eventual ansiedade no período de tempo necessário para aguardar a resposta dos resultados dos testes diagnósticos.

4. benefícios que poderão ser obtidos;
Determinar um marcador precoce de lesão hepática em pacientes com Hepatite pelo vírus C

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.
Permitir a elaboração e posterior implementação de estratégia de intervenção específica para a população alvo, visando o controle da infecção pelo vírus da hepatite C.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

Esclarecimento sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento, a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento do indivíduo:

Sim ()

Não ()

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

Esclarecimento sobre a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo a continuação do seu cuidado e tratamento:

Sim ()

Não ()

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Compromisso sobre a segurança de que não se identificará o indivíduo e que se manterá o caráter confidencial da informação relacionada com a sua privacidade:

Sim ()

Não ()

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Disponibilidade de assistência médica no HC-FMUSP

Sim ()

Não ()

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Sim ()

Não ()

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Pesquisadores Responsáveis:

**Dr EVANDRO A. B. OLIVEIRA Jr.
Prof. Dr. MARCELO N. BURATTINI**

**LABORATÓRIO CENTRAL-HCFMUSP
RUA Dr. ENÉAS DE CARVALHO AGUIAR Nº 155
2º ANDAR – BLOCO 9
BAIRRO – CERQUEIRA CESAR CEP - 05403010
FONE : 30696116 / 30696117**

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Você poderá receber os resultados dos exames pessoal e sigilosamente assim que estejam disponíveis.

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome Legível)

Anexo B - Características gerais dos pacientes

N	NOME	ALT	AST	GGT	AE	IIPS	APPPS	AP	SEXO	aGST	NASCIMENTO
1	IOF	76	34	24	1	3	2	2	M	5.4	out/63
2	NAN	71	20	10	0	1	0	1	M	3.7	nov/73
3	ATDT	94	40	35	3	2	3	2	M	6.8	jul/59
4	LPO	58	66	128	2	2	2	2	F	9.2	abr/51
5	CNB	58	35	203	2	2	3	1	M	6.2	out/46
6	EPAF	62	46	40	2	3	3	1	F	7.2	dez/63
7	ZAPC	85	80	116	4	2	3	2	F	5.1	jun/42
8	KFP	122	74	120	2	2	3	2	M	42.1	jan/71
9	ACRBM	103	65	14	1	4	2	3	F	10.1	abr/44
10	LSS	145	40	50	2	2	2	2	M	13.1	mar/39
11	AAM	102	47	22	1	3	2	1	M	9.4	jan/50
12	MAIL	53	35	30	0	1	0	1	M	6.6	fev/78
13	LH	50	45	20	1	2	2	2	F	8.0	mai/63
14	SCP	38	33	17	1	2	2	2	F	6.4	jun/60
15	ASM	343	195	35	2	2	1	1	F	31.9	nov/73
16	MPS	44	38	43	X	X	X	X	F	5.7	mai/40
17	JSB	50	45	125	1	3	2	1	M	5.0	ago/76
18	LCF	49	37	118	2	2	1	2	F	12.9	mai/53
19	EL	56	55	37	3	2	3	2	F	4.2	nov/33
20	BDS	35	22	23	0	1	0	1	M	4.3	mai/67
21	RDS	27	57	25	2	2	2	1	M	9.5	mai/78
22	RFM	214	76	52	1	2	3	1	M	72.1	jan/79
23	FF	32	31	17	1	2	2	2	M	3.9	jan/75
24	JOC	51	30	20	0	1	0	1	M	5.3	mar/58
25	MOV	34	22	28	1	2	1	2	M	4.1	jun/77
26	TCZA	10	18	20	3	3	2	1	F	3.8	ago/51
27	AAD	19	25	25	0	1	0	1	M	4.0	nov/71
28	EAR	68	68	116	2	2	2	2	F	6.6	jan/60
29	MAP	44	63	166	2	1	2	2	F	5.3	fev/57
30	CES	20	18	62	1	2	1	1	F	4.8	abr/73
31	ACA	45	28	15	0	1	0	1	F	4.7	set/76
32	TA	67	38	24	0	2	0	1	F	6.8	mai/72
33	SJS	243	144	283	2	3	3	2	M	14.9	abr/60
34	NAC	127	119	302	2	3	3	2	M	9.4	out/60
35	JMD	60	51	44	X	X	X	X	M	7.0	mar/62
36	AM	45	32	10	0	1	1	1	F	4.6	jun/77
37	ASS	204	73	46	1	3	2	2	M	16.4	jul/79
38	LCM	78	33	54	1	3	2	1	M	10.6	nov/64
39	AAC	48	35	15	1	3	2	1	F	10.7	jun/64
40	MRS	34	21	65	0	0	0	1	M	6.4	mar/79
41	Vera HGL	38	30	37	1	2	1	2	F	4.1	fev/65
42	MJSA	21	27	17	0	1	0	1	F	4.3	dez/71
43	WOM	23	21	14	X	X	X	X	F	4.1	mar/57
44	MLCS	34	24	18	1	2	2	2	F	4.6	out/58
45	ACCM	22	21	64	X	X	X	X	F	4.0	jan/60
46	ECP	32	30	18	2	2	2	2	F	4.9	ago/77
47	LB	25	17	52	X	X	X	X	F	4.2	abr/79
48	DJS	62	45	61	1	3	3	2	M	6.2	ago/55
49	CAV	33	29	40	0	1	0	1	M	4.3	set/55
50	DMP	22	18	23	1	2	0	1	M	3.8	abr/58
51	MCA GO	17	22	10	0	1	0	1	F	4.2	fev/46
52	DAAP	42	40	230	X	X	X	X	F	5.0	dez/37
53	FSC	57	30	77	0	2	1	1	M	5.9	dez/75
54	JMS	46	29	125	2	2	1	1	M	5.5	dez/53
55	PRP	96	76	144	3	2	2	2	M	8.7	nov/55
56	SBS	42	37	16	1	2	2	1	M	5.8	jan/68
57	VP	58	65	31	X	X	X	X	M	6.7	jan/55
58	CMP	27	16	18	1	2	2	2	F	5.8	set/77
59	AAS	191	138	86	1	X	2	2	M	19.5	mar/39
60	CAS	82	43	25	2	2	1	1	M	6.8	fev/54
61	MISC	43	36	58	1	3	2	2	F	10.3	jan/44
62	RB	102	61	180	2	3	2	3	M	9.1	jan/56
63	RCABC	59	34	178	0	2	2	2	F	18.7	out/68
64	JSSA	43	45	17	X	X	X	X	M	6.8	jan/72
65	CAB	85	45	50	1	2	2	2	M	8.9	out/57
66	ACS	72	51	35	3	2	2	2	M	16.7	nov/54
67	CROB	57	33	22	1	3	2	2	F	5.6	ago/77

68	NPF	65	45	119	X	X	X	X	F	6.4	mar/41
69	CAPP	82	60	23	1	2	0	1	M	7.1	ago/75
70	JRS	51	46	91	1	2	0	2	M	7.2	fev/74
71	SMNL	55	38	16	1	X	1	1	F	7.0	jan/72
72	ERB	60	58	39	1	2	0	0	F	8.3	jul/79
73	AESR	66	48	30	1	2	1	1	M	6.2	mar/72
74	MAS	51	36	59	1	2	2	2	F	6.4	dez/64
75	ARNF	43	36	31	0	2	2	1	F	4.8	jan/51
76	MPB	63	38	46	X	X	X	X	M	6.2	mar/80
77	PPS	34	28	21	X	X	X	X	M	4.7	mar/74
78	MAM	37	27	22	1	3	2	2	F	10.0	fev/61
79	LAGS	85	32	16	1	2	2	1	M	6.0	ago/77
80	MAFF	78	78	56	2	3	3	4	F	9.5	fev/61
81	LAC	52	30	21	X	X	X	X	M	4.7	abr/56
82	ACC	112	90	119	3	3	2	1	M	12.5	mar/60
83	TCS	91	80	47	3	2	1	1	F	7.2	fev/44
84	AGS	19	13	18	1	1	1	1	F	3.2	dez/60
85	EAM	42	34	53	2	2	0	1	M	3.8	nov/75
86	DSB	48	31	23	X	X	X	X	F	7.1	fev/60
87	AOS	72	100	142	4	2	2	2	M	5.9	mar/65
88	VC	37	30	21	1	1	0	1	F	4.6	mar/82
89	SMC	25	24	251	0	1	0	1	F	3.7	mar/54
90	SPS	22	20	16	0	2	1	1	F	3.4	set/71
91	MAV	35	28	45	X	X	X	X	M	3.9	nov/75
92	AJR	25	27	82	1	1	2	2	M	4.3	fev/57
93	FB	17	20	11	0	1	0	1	F	3.2	set/77
94	OSG	49	45	105	0	2	2	1	F	4.9	out/57
95	RJS	54	41	23	1	3	2	2	F	11.4	mar/60
96	OO	34	28	43	1	X	2	1	M	4.9	fev/43
97	CBG	54	30	59	3	3	2	2	M	6.9	nov/51
98	ETS	87	46	124	1	3	3	3	M	6.1	dez/69
99	JC	29	31	112	X	X	X	X	M	3.7	mai/57
100	MIGF	126	70	44	1	2	2	0	M	6.8	dez/53
101	GCRF	64	46	54	1	3	2	2	M	6.9	fev/71
102	MLT	143	176	156	X	X	X	X	F	8.9	out/50
103	CRRS	60	48	35	1	1	0	1	F	4.8	jun/74
104	EFB	55	37	28	1	2	0	0	F	3.7	mai/54
105	ARO	42	33	12	1	2	1	2	M	4.7	dez/73
106	MFM	60	33	73	4	2	1	1	F	4.5	21/jan
107	MSM	804	690	197	X	X	X	X	F	128.9	dez/52
108	MSTR	64	52	122	1	3	2	2	F	6.7	jul/53
109	EOC	24	18	42	1	1	0	1	F	3.6	jul/72
110	MCRT	22	18	18	1	2	2	1	M	3.4	fev/78
111	AFO	47	32	35	1	2	1	1	M	4.2	mar/64
112	CLS	18	18	75	X	1	0	1	F	4.3	out/76
113	ALSI	29	38	18	1	1	0	1	M	3.4	mar/75
114	MJSS	15	18	36	0	1	0	1	M	3.3	ago/76

ALT ALANINA-AMINOTRANSFERASE, AST ASPARTATO-AMINOTRANSFERASE, GGT GAMA GLUTAMIL TRANSFERASE, AE ALTERAÇÃO ESTRUTURAL, IIPS INFILTRADO INFLAMATÓRIO PORTAL/SEPTAL, APPPS
ATIVIDADE PERIportal/PERISSEPTAL E AP ATIVIDADE PARENQUIMATOSA

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Ackerman Z, Ackerman E, Paltiel O. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: a systematic review. *J Viral Hepatol.* 2000; 7 (2): 93-103.

Adams G, Kuntz S, Rabalais G, Bratcher D, Tamburro CH, KOTWAL GJ. Natural recovery from acute hepatitis C vírus infection by agammaglobulinemic twin children. *Pediatr Infect Dis J.* 1997; 16: 533-4.

Addya S, Mullick J, Fang JI, K, Avadhani NG. Purification and characterization of a hepatic mitochondrial glutathione S-transferase exhibiting immunochemical relationship to the alpha-class of cytosolic isoenzymes. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 310: 82-8.

Ades AE, Parker S, Walker J, Cubitt WD, Jones R. HCV prevalence in pregnant women in the UK. *Epidemiol Infect.* 2000; 125 (2): 339-405.

Akahane Y, Kojima M, Sugay Y, Sakamoto M, Miyzaki Y, Takana T, Tsuda F. Hepatitis C vírus infection in spouses of patients with type C chronic liver disease. *Ann Intern Med.* 1994; 120: 748-52.

Akbar SM, Onji M, OHTA Y. Estimulation of IgG subclasses of anti-HCV (c100-3) in non-A, non-B fulminant, acute and chronic hepatitis and its significance. *Gastr Jon.* 1992; 27: 514-20.

Alberti A. Diagnosis of hepatitis C, facts and perspectives. *J Hepatol.* 1991, 12: 279-82.

Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, Mares A, Alexander J, Hu PY, Miller JK, Moyer LA, Fields HA, Bradley, DW, Margolis, HS. Risk factors for acute Non-

A, Non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C vírus infection. *JAMA*. 1990; 264: 2231-5.

Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med*. 1992; 327 (27):1899-905.

Alter MJ, Mast EE. The epidemiology of viral hepatitis in the United States. *Gastroenterol Clin North Am*. 1994; 23: 437-45.

Alter MJ. Residual risk of transfusion-associated hepatitis. NIH Consensus Development Conference on Infectious Disease Testing for Blood Transfusions. Bethesda: 1995. p. 23-7.

Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology*. 1997; 26(Suppl 1): 62S-5S.

Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslov RA, Margolis HS. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med*. 1999; 341: 556-62.

Arber N, Konikoff FM, Moshkowitz M. Increased serum iron saturation without liver iron accumulation distinguishes chronic hepatitis C from other chronic liver diseases. *Dig Dis Sci*. 1994; 39: 2656-9.

Asfora L, Medeiros G, Schreiber S, Gadelha F, Souza AC, Silva MM, Costa CAS, Queiroz S, Cunha F, Carrazzone C, Medeiros LA. Antibody to hepatitis C in blood donors in northeast of Brazil, Recife. [Abstract TTD-26] *Rev Paul Med*. 1992; 110.

- Barrera JM, Bruguera M, Guadalupe-Ercilla M, Gil C, Celis R, Gil MP, Del Valle Onorato MV, Rodés J, Ordinas A. Persistent hepatitis viremia after acute self-limiting post-transfusion hepatitis C. *Hepatology*. 1995; 21: 639-44.
- Beckett GJ, Chapman BJ, Dyson EH, Hayes JD. Plasma glutathione S-transferase measurement after paracetamol overdose: evidence for early hepatocellular damage. *Gut*. 1985; 26: 26-31.
- Beckett GJ, Hayes D. Plasma glutathione S-transferase measurements and liver disease in man. *J Clin Biochem Nutr*. 1987; 2: 1-24.
- Beckett GJ, Hussey AJ, Laing I, Forbes Howie A, Hayes JD, Strange C, ET AL. Measurement of glutathione S-transferase B1 in plasma after birth asphyxia: an early indication of hepatocellular damage. *Clin Chem*. 1989; 35: 995-9.
- Beckett GJ, Foster GR, Hussey AJ, Oliveira DBG, Donovan JW, Prescott LF, et al. Plasma glutathione S-transferase and F protein are more sensitive than alanine aminotransferase as markers of paracetamol (acetaminophen)-induced liver damage. *Clin Chem*. 1989;35:186-9.
- Berg T, Mas Marques A, Hohne M, Wiedenmann B, Hopf U, Schreier E. Mutations in the E2-PePHD and NS5A region of hepatitis C virus type 1 and the dynamics of hepatitis C viremia decline during interferon alpha treatment. *Hepatology*. 2000; 32 (6):1386-95.
- Bertoletti A, Sette A, Chisari FV, Penna A, Levrero M, DeCarli M, Fiaccadori F, Ferrari C. Natural variants of cytotoxic epitopes are T cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature*. 1994; 369: 407-10.
- Bertoletti A, Dèlios MM, Boni C, Carli M, Zignego AL, Durazzo M, Missale G, Penna A, Fiaccadori F, Del Prete G, Ferrari C. Different cytokine profile of

- intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 1997; 112: 193-9.
- Booth JCL, Brown JL, Thomas HC. The management of chronic hepatitis C virus infection. *Gut*. 1995; 37: 449-54.
- Boran M, Çetin S. The role of alpha-glutathione-S-transferase in monitoring of hemodialysis patients with hepatitis C virus infection undergoing high-dose interferon-alpha-2b therapy. *Nephron*. 1999; 82 (1): 22-6.
- Boyer JL, Klatskin G. Pattern of necrosis in acute viral hepatitis: prognostic value of bridging (subacute hepatic necrosis). *N Engl J Med*. 1970; 283: 1063-71.
- Boyer N, Marcellin P. Natural history of hepatitis C and the impact of anti-viral therapy. *Forum*. 2000; 1: 4-18.
- Boyer TD. The glutathione S-transferases: an update. *Hepatology*. 1989; 9: 486-96.
- Brown EA, Zhang H, Ping L- H, Lemon SM. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res*. 1992; 20: 5041-5.
- Bruno S, Silini E, Crosignani A, Borzio F, Leandro G, Bono F, Asti M, Rossi S, Larghi A, Cerino A, Podda M, Mondelli MU. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology*. 1997; 25: 754-8.
- Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: Quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis*. 1995; 15:41-63.

Cabot B, Esteban JI, Martell M, Genesca J, Vargas V, Esteban R, Guardia J, Gomez J. Structure of replicating hepatitis C virus (HCV) quasispecies in the liver may not be reflected by analysis of circulating HCV virions. *J Virol*. 1997; 71: 1732-4.

Campiotto S. Distribuição dos genótipos do vírus da hepatite C (HCV) nas diferentes regiões brasileiras [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Carrilho FJ, Corrêa MCJM. Magnitude of hepatitis B and C in Latin Americ. In: Schinazi RF, Sommadossi J-P, Thomas HC, editors. *Therapies for viral hepatitis*., London: Int Med Press, 1998. p. 25-34.

Carrilho FJ, Clemente C. Epidemiologia hepatites agudas e crônicas. 3^a ed. São Paulo: Sarvier; 2003.

Carvalho HB.; Mesquita FC; Massad E; Bueno RC; Lopez GT; Ruiz MA & Burattini MN. HIV and Infection of similar transmission patterns in a drug injectors community of Santos, Brazil. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome and Human Retrovirology* 1996; 12 (1): 84-92.

Chang T-T, Liou T-C, Young K-C, Lin X-Z, Lin C-Y, Shin J-S, Wu H-L. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: the important role of inapparent transmission. *J Med Virol* 1994; 42: 91-6.

Chang K-M, Reherrmann B, Mc Hutchison JG, Pasquinelli C, Southwood S, Sette A, Chisari FV. Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the hepatitis C virus. *J Clin Invest*. 1997; 100: 2376-85.

Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis*. 2003; 7 (1):89-105.

Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, Okamoto K, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Suzuki Y, Murashima N, Ikeda K, Kumada H. Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 1997; 25: 745-9.

Chayama K, Suzuki F, Tsubota A, Kobayashi M, Arase Y, Saitoh Y, Murashima N, Ikeda K, Takahashi N, Kinoshita M, Kumada H. Association of amino acid sequence in the PKR-eIF2 α phosphorylation homology domain and response to interferon therapy. *Hepatology*. 2000; 32: 1138-44.

Choo Q-L, Kuo G, Weiner AM, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of cDNA clone derived from a blood borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989; 244: 359-62.

Choo Q-L, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby A, Barr PJ, Weiner AJ, Bradley DW, Kuo G, Houghton M. Genetic organization and diversity of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 6: 2451-5.

Coelho HSM. *Detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite C na prevenção da infecção pós-transfusional pelo vírus da hepatite C* [tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1997.

Collins ML, Irvine B, Tyner D, Fine E, Zayati C, Chang C, Horn, T, Ahle D, Detmer J, Shen L-P, Kolberg J, Bushnell S, Urdea MS, Ho DD. A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/ml. *Nucleic Acids Res*. 1997; 15 :2979-84.

Conry-Cantilena C, Vanraden M, Gible J, Melpolder J, Shakil AO, Viladomiu L, et al. Routes of infection, viremia, and liver disease in blood

donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 1996; 334: 1691-6.

Contreras M, Barbara JA, Anderson CC, Rasinghe E, Moore C, Brennan MT, Rouel DR, Aloysius S, Yardumian A. Low incidence of non-A, non-B posttransfusional hepatitis in London confirmed by hepatitis C virus serology. *Lancet.* 1991; 337: 753-7.

Cuthbert JA. Hepatitis C: Progress and problems. *Clin Microbiol Rev.* 1994; 7: 505-32.

Damen A, Cuypers HTM, Zaaijer HL, Reesink HW, Schaasberg WP, Gerlich WH, Niester HGM, Leile PN. International collaborative study on the second EUROHEP HCV-RNA reference panel. *J Virol Methods.* 1996; 58: 175-85.

Davis GL, Lau JYN, Urdea MS, Neuwald PD, Wilber JC, Lindsay K, Perrilo RP, Albrecht J. Quantitative detection of hepatitis C virus RNA with a solid-phase signal amplification method: definition of optimal conditions for specimen collection and clinical application in interferon-treated patients. *Hepatology.* 1994; 19: 1337-41.

De Francesco R. Molecular virology of hepatitis C virus. *J Hepatol.* 1999; S1: 47-53.

Delladetsima JK, Rassidakis G, Tassapoulos NC, Papatheodoridis GV, Smyrnof T, Vafiadis I. Histopathology of chronic hepatitis C in relation to epidemiological factors. *J Hepatol.* 1996; 24:27-32.

Demitri MS, Poussin K, Baccarini P, Pontisso P, D'errico A, Simon N, Grigioni W, Alberti A, Beaugrand M, Pisi E. HCV- associated liver cancer without cirrhosis. *Lancet.* 1995; 345: 413-5.

Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Sheuer P. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology*. 1994; 19: 1513-20.

Degroote J, Desmet VJ, Gedigk P, Korb G, Popper Poulsen, H, Scheuer PJ, Schmid M, Thaler H, Uehling E, Wepler W. A classification of chronic hepatitis. *Lancet*. 1968; 2:6.

Dickson RC, Lauwers GY, Rosen CB, Cantwell R, Nelson DR, Lau JYN. The utility of noninvasive serologic markers in the management of early allograft rejection in liver transplantation recipients. *Transplantation*. 1999; 68: 247-53.

Dienstag JL. Sexual and perinatal transmission of Hepatitis C. *Hepatology*. 1997; 26(3 Suppl 1):66s-70s.

Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga, Santantonio T, Jung MC, et al. Possible mechanism involvement lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet*. 1995; 346: 1006-7.

Diepolder HM, Jung MC, Wierenga E, Hohmann RM, Zachoval R, Gerlach TJ, et al. Anergic TH1 clones specific for hepatitis B virus (HBV) core peptides are inhibitory to other HBV core-specific CD4⁺ T-cells in vitro. *J. Virol*. 1996; 70: 7540-8.

Diepolder HM, Gerlach J-T, Zachoval R, Hoffman RM, Jung MC, Wierenga EA, Scholz S, Santantonio T, Houghton M, Southwood S, Sette A, Pape GR. Immunodominant CD4⁺ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J Virol*. 1997; 71: 6011-9.

Ducos J, Bianchi-Mondain A-M, François M, Boisset M, Vendrell J-P, Baring F, Serre A, Larrey D. Hepatitis C virus (HCV) – specific *in vitro* antibody

secretion by peripheral blood lymphocytes: correlation with progression of disease and HCV-RNA in HCV antibody positive patients. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 2613-5.

Dusheiko G, Simonds P. Sequence variability of hepatitis C virus and its clinical relevance. *J Viral Hepat.* 1994; 1:3-15.

Ebeling F. Alanine aminotransferase, gamma-glutamyltransferase, antibodies to hepatitis B core antigens and antibodies to hepatitis C virus in blood donor screening. *Vox Sang.* 1991; 60:219-24.

Ebeling F, Lappalainen M, Vuoristo M, Nuutinen H, Leino R, Karvonen AL, Lehtola J, Julkunen R, Pohjanpelto P, Farkkila M. Factors predicting interferon treatment response in patients with chronic hepatitis C: late viral clearance does not preclude a sustained response. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96 (4): 1237-42.

El-Zayadi A, Selim O, El Haddad S, Hamdy H. Combination treatment of alpha interferon-2b and Ribavirin in chronic hepatitis C genotype 4 patients resistant to interferon therapy. *Hepatology.* 1995; 22 (Pt 2):152a.

Engström-Laurent A, Lööf L, Nyberg A, Schröder T. Increased serum levels of hyaluronate in liver disease. *Hepatology.* 1985; 5 (4): 638-42.

Enomoto N, Kurosaki M, Tanaka Y, Marumo F, Sato C. Fluctuation of hepatitis C virus quasispecies in persistent infection and interferon treatment revealed by single-strand conformation polymorphism analysis. *J Gen Virol.* 1994; 75: 1361-9.

Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi N, Marumo F, Sato C. Comparison of full-length sequences of interferon sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon

is conferred by amino acid substitution in the NS5A region. *J Clin Invest*. 1995; 96: 224-30.

Enomoto N, Sakura I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izunmi N, Makuro F, Sato C. Mutations in the nonstructural protein 5^A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med*. 1996; 334: 77-81.

Enomoto M, Nishiguchi S, Shiomi S, Tanaka M, Yokogawa T, Fukuda K, Ueda T, Tamori A, Hadu D. Changes in serum levels of hepatitis C virus genotype 1b monitored by real-time quantitative polymerase chain reaction as a predictor of long term response to interferon-alpha treatment. *Am J Gastroenterol*. 2002; 97 (2):420-6.

Eyster ME, Alter HJ, Aledort LM, Quan S, Hatzakis A, Goedert JJ. Heterosexual co-transmission of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV). *Ann Intern Med*. 1991; 115 (10): 764-8.

Farci P, Alter HJ, Wong DC, Shih JW, Jett B, Purcell RH. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med*. 1991; 325: 98-104.

Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewski RR, Mushhwar IK. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science*. 1992; 258: 135-40.

Farci P, Shinda P, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, Strazzera A, Chien DY, Munoz SJ, Balestrieri A, Purcell RH, Alter HJ. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*. 2000; 288: 339-44.

Farci P, Strazzera R, Alter HJ, Farci S, Degioannis D, Coiana A, Peddis G, Usai F, Serra G, Chessa L, Diaz G, Balestrieri A, Purcell RH. Early changes

in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 3081-6.

Farinati F, Cardin R, De Maria N. Iron storage lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol*. 1995; 22: 449-56.

Fernandez I, Rubio R, Lumbreras C. Hepatitis C in HIV-infected patients-therapeutic approach. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8 (2): 80-4.

Ferrari C, Valli A, Galati L, Penna A, Scaccaglia P, Giuberti, et al. T-cell response to structural and non structural hepatitis C antigens in persistent and self-limited hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 1994; 19: 286-95.

Figueiredo VM. *Comportamento clínico, bioquímico, virológico e histológico de doadores de sangue anti-HCV positivos de acordo com o fator de risco para aquisição do vírus da hepatite C* [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina; 1998.

Flint M, Mc Keating JA. The role of hepatitis C virus glycoproteins in infection. *Rev Med Virol*. 2000; 10: 101.

Fukumoto T, Berg T, Ku Y, Bechstein WO, Knoop M, Lemmens H-P, Lobeck H, Hopf U, Neuhaus P. Viral dynamics of hepatitis C early after orthotopic liver transplantation: evidence for rapid turnover of serum virions. *Hepatology*. 1996; 24: 1351-4.

Gayotto LCC, Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. *GED*. 2000; 3: 137-40.

Gerber MA. Pathobiologic effects of hepatitis C. *J Hepatol*. 1995; 22 (suppl): 83-6.

Gerlach JT, Diepolder HM, Jung M-C, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4⁺ T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*. 1999; 117: 933-41.

Gerotto MDAL, Pero F, Pontisso, P, Noventa F, Gatta A, Alberti A. Two PKR inhibitor HCV proteins correlate with early but not sustained response to interferon. *Gastroenterology*. 2000; 119 (6): 1649-55.

Giannini E, Risso D, Ceppa P, Botta F, Chiarbonello B, Fasoli A, Malphatti F, Romagnoli P, Lantieri PB, Testa R. Utility of α -glutathione-S-transferase assessment in chronic hepatitis C patients with near normal alanine aminotransferase levels. *Clin Biochem*. 2000; 33 (4): 297-301.

Giannini E, Mastracci L, Botta F, Romagnoli P, Fasoli A, Risso D, Faravelli F, Ceppa P, Lantieri PB, Icardi GC, Testa R. Liver iron accumulation in chronic hepatitis C patients without hfe mutations: relationships with histological damage, viral load and genotype and α -glutathione s-transferase levels. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001; 1 (11): 1355-61.

Gibb DM, Goodall RL, Dunn DT, Healy M, Neave P, Cafferkey M, Butler K. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: evidence for preventable peripartum transmission. *Lancet*. 2000; 356 (9233): 904-7.

Giuberti T, Marin MG, Ferrari C. Hepatitis C virus viremia following clinical resolution of acute hepatitis C. *J Hepatol*. 1994; 20: 666-71.

Goodman ZD, Ishak KG. Histopathology of hepatitis C virus infection. *Semin. Liver Dis*. 1995; 15: 70-81.

Graf J, Toriyama K, Itakura H. A clinico-pathological study of 163 untreated cases of chronic hepatitis C. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1996; 29: 21-5.

Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus poliprotein cleavage products. *J Virol*. 1993; 67 (3): 1385-95.

Granero LCS. *Comportamento das lesões hepáticas de acordo com a forma de aquisição do vírus, viremia e tempo de infecção em pacientes anti-HCV positivo* [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina; 1999.

Gretch DR. Diagnostics tests for hepatitis C. *Hepatology*. 1997; 26: 43s-7s.

Guidotti LG, Ando K, Hobbs MV, Ishikawa T, Runkel L, Schreiber RD, Chisari FV. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 3764-8.

Haber MM, West AB, Path MRC, Haber AD, Reuben A. Relationship of aminotransferases to liver histological status in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*. 1995; 90: 1250-7.

Han JH, Shyamala V, Rickman KH, Brauer MJ, Irvine B, Urdea MS, Tekamp-Olson P, Kuo G, Choo Q-L, Houghton M. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly A tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 1711-5.

Harris HE, Ramsay ME, Andrews N, Eldridge K. Clinical course of hepatitis C virus during the first decade of infection: cohort study. *BMJ*. 2002; 324: 1-6.

Harrison DJ, May L, Hayes PC, Haque MM, Hayes JD. Glutathion S-transferases in alcoholic liver disease. *Gut*. 1990; 31: 909-12.

Hayes JD, Wolf CR. Role of glutathion- transferase in drug-resistance. In: Sies, H.; Ketterer, B. editors. *Glutathion conjugation*. London: Academic Press; 1988. p. 315-55.

Hayes PC, Bouchier IAD, Beckett GJ. Glutathione S-transferase in humans in health and disease. *Gut*. 1990; 32: 813-8.

Hayes PG, Hussey AJ, Keating J, Bouchier IAD, Willinas R, Beckett GJ ET AL. Glutathione S- transferase levels in autoimmune chronic active hepatitis: a more sensitive index of hepatocellular damage than aspartate transaminase. *Clin Chim Acta* 1988; 172: 211-6.

He XS, Rehmann B, Lopez-Labrador FX, Boisvert J, Cheung R, Mumm J, et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 5692-7.

He Y, Katze MG. To interfere and to anti-interfere: the interplay between hepatitis C virus and interferon. *Viral Immunol*. 2002; 15 (1): 95-119.

Hiley C, Fryer A, Bell J, Hume R, Strange C. The human glutathione S-transferases: immunohistochemical studies of the developmental expression of Alpha-and Pi-class isoenzymes in liver. *Biochem J*. 1988; 254: 255-9.

Hillemanns P, Dannecker C, Kimmig R, Hasbargen U. Obstetric risks and vertical transmission of hepatitis C virus infection in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000; 79 (7): 543-7.

Hiroishi K, Kita H, Kojima M, Okamoto H, Moriyama T, Kaneko T, Ishikawa T, Ohnishi S, Aikawa T, Tanaka N, Yazaki Y, Mitamura K, Imawari M. Cytotoxic T lymphocyte response and viral load in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 1997; 25: 705-12.

Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. In: *Consensus development conference on management of hepatitis C*. Bethesda; 1997. p. 19-22. [Program and abstracts]

Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo Bq-L. Molecular biology of hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*. 1991; 14: 381-8.

Houghton M. Strategies and prospects for vaccination against the hepatitis C viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000; 242: 327-39.

Hussey AJ, Howie J, Alaan LG, Drummond G, Hayes JD, Beckett GJ. Impaired hepatocellular integrity during general anaesthesia, as assessed by mensurement of plasma glutathione S- transferase. *Clin Chim Acta*. 1986; 161: 19-28.

Hussey AJ, Aldridge LM, Paul D, Ray DC, BecketT GJ, Allan LG. Plasma glutathione S- transferase concentration as a mensure of hepatocellular integrity following single general anaesthetic with halothane, enflurane or isoflurane. *Br Anaesth*. 1988; 60: 103-5.

Hwang SJ, Luo JC, Lai CR, Chu CW, Tsay SH, Lu CL, et al. Clinical, virological and pathologic significance of elevated serum gama-glutamyl transpeptidase in patients with chronic hepatitis C. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* (Taipei). 2000; 63 (7): 527-35.

Imawari M. Measurement of HCV-specific CD8⁺ cytotoxic T-cell activities in the peripheral blood by europium release assay. In: Lau JYN. *Hepatitis C protocols*. New Jersey: Humana Press; 1998. p. 423-9.

Ippolito G, Puto V, Petrosilo N, De Carli G, Micheloni G, Magliano E. Simultaneous infection with HIV and hepatitis C virus following occupational conjunctival blood exposure. *JAMA*. 1998; 280: 28.

- Jackson IM. Management of hepatitis C in the patient with normal ALT. *DDW 2000 Schering Symposium Coverage*.
- Kamitsukasa H., Harada H, Yakura M, Fukuda A, Ohbayashi A, Saito I, Miyamura T, Choo QL, Houghton M, Kuo G. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus. *Lancet*. 1989; 2 (8669): 987.
- Kassem AS, El-Nawawy AA, Massoud MN, El-Nazar SY, Sobhi EM. Prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection and its vertical transmission in Egyptian pregnant women and their newborns. *J Trop Pediatr*. 2000; 46 (4): 231-3.
- Katayama T, Mazda T, Kikushi S, Harada S, Matsura Y, Chiba J, Ohba H, Saito I, Miyamura T. Improved serodiagnosis of Non-A, Non-B hepatitis by an assay detecting antibody to hepatitis C virus core antigen. *Hepatology*. 1992; 15: 391-4.
- Kato N, Yokosuka O, Omata M, Hosoda K, Ohto M. Detection of hepatitis C virus ribonucleic acid in the serum by amplification with polymerase chain reaction. *J Clin Invest*. 1990; 86: 1764-7.
- Kato N, Sekiya H, Ootsuyama Y, Nakazawa T, Hijikata M, Ohkoshi I. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative glycoprotein (gp 70) of hepatitis C virus. *J Virol*. 1993; 67: 3923-30.
- Kato N, Ootsuyama Y, Sekiya H, ET AL. Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *J Virol*. 1994; 68: 4775-84.
- Kato N, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus genotypes: molecular basis and clinical significance. In: *Progress in liver diseases*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1996. v. 14, p. 223-45.

Kawatanl T, Suou T, Tajima F, Ishiga K, Omura H, Endo A, Ohmura H, Ikuta Y, Idobe Y, Kawasaki H. Incidence of hepatitis virus infection and severe liver dysfunction in patients receiving chemotherapy for hematologic malignancies. *Eur J Haematol*. 2001; 67 (1):45-50.

Kenny-Walsh E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. *N Engl J Med*. 1999; 340: 1228-33.

Knodell GR, Ishak GK, Black CW, Chen ST, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan WT, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*. 1981; 1: 43135.

Ko Y-C, Ho M-S, Chang S-J, Chang P-Y. Tatooing as a risk of hepatitis C virus infection. *J Med Virol*. 1992; 38: 288-91.

Kobayashi M, Tanaka E, Matsumoto A, Ichijo T, Kiyosawa K. Antibody response to E2/NS1 hepatitis C virus protein in patients with acute hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997; 12: 73-6.

Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3'nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol*. 2000; 74: 2046-51.

Koretz RL, Abbey H, Coleman E, Gitnick G. Looking back in the second decade. *Ann Intern Med*. 1993; 119: 110-5.

Korth MJ, Katze MG. Evading the interferon response: hepatitis C virus and the interferon-induced protein kinase, PKR. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000; 24: 197-224.

Koziel MJ, Dudley D, Afdhal N, Grakoul A, Rice CM, Choo Q-L, Houghton M, Walker BD. HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release. *J Clin Invest.* 1995; 96: 2311-21.

Koziel MJ. Mechanisms of Liver injury in Hepatitis C infection. In Kaplowitz N, editor. *Liver injury update: clinical complications and mechanistic role of cells of the liver disease*, Chicago: American Association for the study of liver disease. Pos Graduate Course; 1997. p. 131-44.

Krug LP, Lunge VR, Ikuta N, Fonseca AS, Cheinquer H, Ozaki LS, Barros SG. Hepatitis C virus genotypes in Southern Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 1996; 29 (12): 1629-32.

Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnik GL, Redeneck AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, Tegtemeir GE, Shuster JR, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. An assay for circulating antibodies to a major etiology virus of human Non-A, Non-B hepatitis. *Science.* 1989; 244: 362-4.

Kwon SO, Park Y, Whalen R, Boyer TD. Regulation of the glutathione S-transferase [GST] by interleukine 6 [IL6] and dexamethasone [DEX]. *Hepatology.* 1995, 22: 1039. [Abstract].

Lai ME, Mazzoleni AP, Argioli F, De Virgilis S, Balestriesi A, Purcell RH. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet.* 1994; 343: 388-90.

Lamonaca V, Missale G, Urbani S, Pilli M, Boni C, Mori C, Sette A, Massari M, Southwood S, Bertoni R, Valli A, Fiaccadori F, Ferrari C. Conserved hepatitis C virus sequences are highly immunogenic for CD4⁺ T cells: Implications for vaccine development. *Hepatology.* 1999; 30: 1088-98.

Lanford RE, Chavez D, Chisari FV, Sureau C. Lack of detection of negative-strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and other extrahepatic tissues by the highly strand-specific rTth reverse transcriptase PCR. *J Virol.* 1995; 69: 8079-83.

Lanzavecchia A. Understanding the mechanism of sustained signaling and T cell activation. *J Exp Med.* 1997; 185: 1717-9.

Lau JYN, Davis G, Kniffen J, Quian K-P, Urdea M, Chan C, Mizokami M, Wilber J. Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet.* 1993; 341: 1501-4.

Lau J, Krawczynski K, Negro F, Gonzales-Peralta R. In situ detection of hepatitis C virus – a critical appraisal. *J Hepatol.* 1996; 6: 43-51.

Lau JYN. *Hepatitis C protocols*. New Jersey: Human Press; 1998.

Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2001; 345: 41-52.

Laurent C, Henzel D, Mulanga-Kabeya C, Maertens G, Larouze B, Delaporte E. Seroepidemiological survey of hepatitis C virus among commercial sex workers and pregnant women in Kinshasa Democratic Republic of Congo. *Int J Epidemiol.* 2001; 30 (4): 872-7.

Lechner F, Wong DKH, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med.* 2000; 191: 1499-1512.

Lin HH, Kao JH, Hsu HY, Ni YH, Yeh SH, Hwang LH, Chang MH, Hwang SC, Chen PJ, Chen DS. Possible role of high-titer maternal viremia in

perinatal transmission of hepatitis C virus. *J Infected Dis.* 1994; 169 (3): 638-41.

Liou T-C, Chang T-T, Yung K-C, Lin X-Z, Lin C-Y, Wu H-L. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol.* 1992; 37: 197-202.

Loguercio C, Tuccillo C, Caporaso N, Del Vecchio BG, Morisco F, Guerriero C, Di Santolo SS, Valenza LM, Del Vecchio Blanco. Determination of plasma alpha-glutathione-S-transferase in patients with HCV-related chronic infection: its significance and possible clinical relevance. *Liver.* 1998; 18: (3): 166-72.

Lunel F, Cresta O, Vitour D. Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA, NASBA, and monitor assays. *Hepatology.* 1999; 29: 528-35.

Luo JC, Hwang SJ, Chang FY, Chu CW, Lai CR, Wang YJ. Simple blood tests can predict compensated liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2002; 49 (44):478-81.

Mackay IR, Taft LI, Cowling DC. Lupoid hepatitis. *Lancet* 1956; 2: 1323-6.

Maertens G, Stuyver L. Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus. In: Zuckerman A, Harrison T. *Molecular medicine of hepatitis*. Chichester: John Wiley; 1997. p. 183-233. (Molecular Medical Science Series).

Major ME, Mihalik K, Fernandez J, Seidman J, Kleiner D, Kolyhalov AA, Rice CM, Feistone SM. Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus. *J Virol.* 1999; 73: 3317-25.

Mannervik B. The isoenzymes of glutathione transferase [review]. *Adv Enzymol.* 1985; 157: 357-417.

Marcellin P, Martinoti BSM, Boyer N, Lévy S. Treatment of Hepatitis C patients with normal aminotransferases levels. *Clin Liver Dis.* 1999; 4: 843-53.

Massad E; Rozman M; Azevedo RS; Silveira ASB; Takey K; Yamamoto YI; Strazza L; Ferreira MMC; Carvalho HB; Burattini MN. Seroprevalence of HIV, HCV and syphilis in Brazilian prisoners: Preponderance of parenteral transmission. *European Journal of Epidemiology* 1999, 15 (5): 439-445.

Mathurin P, Moussalli J, Cadranel JF, Thibault V, Charlotte F, Dumouchel P, Cazier A, Huraux JM, Devergie B, Vidaud M, Opolon P, Poynard T. Slow progression rate of fibrosis in hepatitis C virus patients with persistently normal alanine transaminase activity. *Hepatology.* 1998; 27 (3):868-72.

Matsumoto R, Watanabe S, Beppu T, Futagawa S. Serum alpha-glutathione-S-transferase a new marker of hepatocellular damage associated with hepatectomy. *Hepatol Res.* 2000; 18 (1): 10-8.

McFarlane IG, Smith HM, Johnson PJ, Bray GP, Vergani D, Willians R. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis pathogenic factor or false positive result? *Lancet.* 1990; 335: 754-7.

Mehal WZ, Juedes AE, Crispe IN. Selective retention of activated CD8⁺ T cells by the normal liver. *J Immunol.* 1999; 163: 3202-10.

Mellor J, Holmes EC, Jarvis LM, Yap PL, Simmonds P. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. *J Gen Virol.* 1995; 76: 2493-507.

Menitove JE, Richards WA, Destrie M. Early U.S. experience with anti-HCV kit in blood donors. *Lancet.* 1990; 336: 244-254.

Merican I, Sherlock S, McIntyre N, Dusheiko GM. Clinical, biochemical and histological features in 102 patients with chronic hepatitis C virus infection. *Q J Med.* 1993; 86: 119-25.

Minutello MA, Pileri P, Unutmaz, ET AL. Compartmentalization of T lymphocytes to the site of disease: intrahepatic CD4⁺ T cells specific for the protein NS4 of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *J Exp Med*. 1993; 178: 17-25.

Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, Houghton M, Fiaccadori F, Ferrari C. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest*. 1996; 98 706-14.

Missale G, Cariani E, Lamonaca V, Ravaggi A, Rossini A, Bertoni R, Houghton M, Matsumara Y, Miyamura T, Fiaccadori F, Ferrari C. Effects of interferon treatment of the antiviral T-cell response in hepatitis C virus genotype 1b and genotype 2c infected patients. *Hepatology*. 1997; 26: 792-7.

MMWR. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for hepatitis B and hepatitis C. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1991; 40 (RR-4): 1-17.

Monazhian M, Bohme I, Bonk S, et al. Low -density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol*. 1999; 57: 223.

Morales A, Garcia-Ruiz C, Colell A, Ballesta A, Fernandez-Checa JC. Bifunctional effect of tumor necrosis factor alpha [TNF-alpha) on the oxidative stress response and NF-kB activation of cultured rat hepatocytes and HepG2 cells. *Hepatology*. 1995; 22: 237A [Abstract].

Morishima C, Gretch DR. Virological tests for hepatitis C. In: AASLD Postgraduate Course – update on viral hepatitis. Dallas: AASL; 2000.

Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkemagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature*. 1993; 362: 758-62.

- Müller D, Jenkins M. Molecular mechanisms underlying functional T-cell unresponsiveness. *Curr Opin Immunol*. 1994; 3: 375-81.
- Murphy MD, Rosen HR, Marousek GI, Chou S. Analysis of sequence configurations of the ISDR, PKR-binding domain, and V3 region as predictors of response to induction interferon- α and ribavirin therapy in chronic hepatitis C infection. *Dig Dis Sci*. 2002; 47 (6): 1195-205.
- Nakamura I, Imawari M. Cellular immune response in HCV infection. *J Gastroenterol*. 2000; 35: 881-9.
- Namour F, Morali A, Ilardo C, Abballe X, Maury F, Gueant J L. Comparison between serum alpha-glutathione-S-transferase and aminotransferases in detecting cytolysis in hepatitis C-infected children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999; 28 (5): 534-7.
- Namour F, Morali A, Ilardo C, Abballe X, Maury F, Gueant JL. Comparison between serum alpha-glutathione S-transferase and aminotransaminases in detecting cytolysis in hepatitis C infected children. *J Pediatr Gastroentero Nutr*. 1999; 28 (5): 534-7.
- Nelson DR, Lim HL, Oliver D, Qian KP, Davis GL, Lau JYN. α -Glutathione-S-transferase (α -GST): Analysis of its utility in chronic hepatitis C (HCV) infection. *Hepatology*. 1994; 20: A240-A240.
- Nelson DR, Lim HL, Oliver D, Qian KP, Davis GL, Lau JYN. Alpha-Glutathione S-transferase as a marker of hepatocellular damage in chronic hepatitis C virus infection. *Clin Chem*. 1995; 104: 193-8.
- Nelson DR. Determination of HCV-specific bulk CD8⁺ activity in liver. In: Lau JYN. *Hepatitis C protocols*. New Jersey: Humana Press; 1998. p. 431-8.

- Nelson DR. The immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis.* 2001; 5 (4): 931-53.
- Nguyen MTMD, Herrine SKMD, Zern MA. Cytokine over in the liver. *Curr Opin Gastroenterol.* 1994; 10: 277-84.
- Niederau C, Lange S, Heintges T, Erhardt A, Buschkamp M, Hurter D. Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study. *Hepatology.* 1998; 28: 1687-95.
- NIH Conference. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med.* 2000; 132: 296-305.
- Novati R, Thiers V, Monforte AA, Maisonneuve P, Principi N, Conti M, Lazzarin A, Brechot C. Mother-to-children transmission of hepatitis C virus detected by nested polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 1992; 165: 720-3.
- Nukui Y, Strauss D, Ballas D. Transmissão pós-transfusional de hepatites B e C. *GED.* 1998;17:S73. [Abstract].
- Nussler AK, Di Silvio M, Billiar TR, Hoffman RA, Geller DA, SELBY R, Madariaga J, Simmons RL. Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med.* 1992; 176: 261-4.
- Nuti S, Rosa D, Valiante NM, Saletti G, Caratozzolo M, Dellabona P, Barnaba V, Abrignani S. Dynamics of intra-hepatic lymphocytes in chronic hepatitis C: enrichment for Valpha24+ T cells and rapid elimination of effector cells by apoptosis. *Eur J Immunol.* 1998; 28: 3448-55.
- Odeberg J, Yun Z, Sönnnerborg A, Bjoro K, Uhlen M, Lundeberg J. Variation of hepatitis C virus hypervariable region 1 in immunocompromised patients. *J Infect Dis.* 1997; 175: 938-43.

Ogasawara S, Kage M, Kosai K, Shimamatsu K, Kojiro M. Hepatitis C virus RNA in saliva and breastmilk of hepatitis C carrier mothers. *Lancet*. 1993; 27(341):8844-61.

Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 3392-6.

Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, Hino K, Ishiwata C, Kako M, Ujiie N, Endo C, Matsui A, et al. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. *N Engl J Med*. 1994; 330 (11): 744-50.

Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Tanaka T, Sugai Y, Akahane Y, Kurai K, Mishiro S, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. Detection of hepatitis C virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pairs of primers deduced from the 5'-non coding region. *Jpn J Exp Med*. 1990; 60: 215-22.

Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Izuka H, Machida A, Miyakawa Y, Mayumi M. Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol*. 1991; 72: 2697-704.

Okamoto H, Kurai K, Okada S, Yamamoto K, Izuka H, Tanaka T, Fukuda S, Isuda T, Nishihiro S. Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reporter isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology*. 1992; 188: 331-41.

Orland JR, Wright TL, Cooper S. Acute hepatitis C. *Hepatology*. 2001; 2: 321-7.

- Pawlotsky JN, Tsakiris L, Roudotthoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis.* 1995; 171: 1601-10.
- Pawlotsky JN, Neumann AU, Conrad A, Hezode C, Schmid P, Dhumeaux D. Hepatitis C virus (HCV) dynamics during induction therapy with interferon (INF) alpha and/or ribavirin. *Hepatology.* 2000; 32: 223.
- Perrilo RP. The role of liver biopsy in hepatitis C. *Hepatology.* 1997; 26 (3 Suppl1): 57s-61s.
- Persico M, Persico E, Suozzo R. Natural history of hepatitis C virus carriers with persistently normal aminotransferase levels. *Gastroenterology.* 2000, 118: 760-4.
- Peters M. Role of immune response in HCV. In: Lau JYN. *Hepatitis C protocols.* New Jersey: Humana Press; 1998. p. 407-11.
- Peterson J, Green G, Lida K, Caldwell B, Kerrison P, Bernich S, Aoyagi K, Lee SR. Detection of hepatitis C core antigen in the antibody negative "Window Phase" of hepatitis C infection. *Vox Sang.* 2000; 78: 80-5.
- Pfeiffer C, Stein J, Southwood S, Ketelaar H, Sette A, Bottomly K. Altered peptide ligands and control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo. *J Exp Med.* 1995; 181: 1569-74.
- Popper HE, Schaffner F. The vocabulary of chronic hepatitis. *N Engl J Med.* 1971; 384: 1154-7.
- Pozzato G, Kaneko S, Moretti M, Saveria L, Franzin F, Unoura M, Bercich L, Tiribelli C, Crovatto M, Santini G, Kobayashi K. Different genotypes of hepatitis C virus are associated with different severity of chronic liver disease. *J Med Virol.* 1994; 43: 291-6.

Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR and DOSVIRC groups. *Lancet*. 1997; 349: 825-32.

Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, Mchutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2001; 34: 730-9.

Pozzato G, Kaneko S, Moretti M, Saveria L, Franzin F, Unoura M, Bercich L, Tiribelli C, Crovatto M, Santini G, Kobayashi K. Different genotypes of chronic. *J Med Virol*. 1994; 43: 291-6.

Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW, Millian SJ. Long-incubation pos-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet*. 1974; 2: 241-6.

Puoti C, Magrini A, Stati T. Clinical, histological, and virological features of hepatitis C vírus carrier with persistently normal or abnormal alanine transaminase levels. *Hepatology*. 1997; 26: 1393-8.

Purcell R. The hepatitis C virus: overview. *Hepatology*. 1997; 26(Suppl1): 11s-4s.

Quer J, Esteban JI. Epidemiology. In: Zucherman AJ, Thomas HC, editors. *Viral hepatitis*. United Kingdom: Churchill Livingstone; 1998. p. 271-83.

Ramadori G, Buschenfelde CHM. Liver cells and cytokines. *Curr Opin Gastroenterol*. 1993; 9: 359-66.

Rehermann B. Immunology of hepatitis C. In: Annual Postgraduated Course of The American Association for the Study Of Liver Disease; 2000. Texas. Update on viral hepatitis. Texas: AASLD; 2000. p. 119-26.

Rehermann B, Chisari FV. Cell mediated immune response to the hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000; 242: 299-325.

Sáez-Alquezar A, Bassit L, Tanaka VM, Nozawa TM, Dorlhiac-Lacer P, Chamone DAF. Prevalência de anticorpos anti-HCV em candidatos à doação de sangue na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia; 1994; São Paulo. *Anais*. São Paulo; 1994. p. 22

Sallie R, Tibbs C, Silva AE, Sheron N, Eddlestone A, Willians R. Detection of hepatitis E but not C in sera of patients with fulminant NA-NB hepatitis. *Hepatology*. 1991; 14: 68A.

Santos, VA. Avaliação de testes imunoenzimáticos para anticorpos antivírus da Hepatite C. Proposta de nova interpretação dos valores obtidos, para uso em diagnóstico clínico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo; 1997.

Sarrazin C, Kornetzky I, Ruster B, Lee JH, Kronenberger B, Bruch K, Roth WK, Zeuzem S. Mutations within the E2 and NS5a protein in patients infected with hepatitis C virus type 3^a and correlation with treatment response. *Hepatology*. 2000; 31: 1360-70.

Sartori M, La Terra G, Aglieta M, Manzin A, Navino C, Verzetti G. Transmission of hepatitis C via blood splash into conjunctiva. *Scand J Infect Dis*. 1993; 25: 270-1.

SBH - Sociedade Brasileira de Hepatologia. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil. *GED*. 1999; 18 (supl 1): 3-8.

Scheuer PJ, Ashrafzadeh P, Scherlock S, Brown D, Dusheiko DM. The pathology of hepatitis C. *Hepatology*. 1991; 15: 567-71.

- Scheuer PJ, Ashrafzede P, Sherlock S, Brown D, Dusheiko GM. The pathology of hepatitis C. *Hepatology*. 1992; 15: 567-71.
- Schiff, E.R.; Medina, M.; Kahn, R. New perspectives in the diagnoses of hepatitis C. *Semin Liver Dis*. 1999; 19: 3-15.
- Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The retrovirus epidemiology donor study. *N Engl J Med*. 1996; 1 (3): 587-602.
- Sharara AI, Hunt CM, Hamilton JD. Hepatitis C. *Ann Intern Med*. 1996; 123: 303-368.
- Sharara AI, Perkins DJ, Misukonis MA, Chan SU, Dominitz JA, Weinberg JB. Interferon (INF)-alpha activation of human blood mononuclear cells in vitro and in vivo for nitric oxide synthase (NOS) type 2 mRNA protein expression: possible relationship of induced NOS2 to the anti-hepatitis C effects of IFN-alpha in vivo. *J Exp Med*. 1997; 186: 1495-502.
- Sherman M, Bass NM, Campbell JAH, Kirsch RE. Radioimmunoassay of human ligandin. *Hepatology*. 1983; 3: 162-9.
- Shimizu YK, Feinstonje SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by eletron microscopy. *Hepatology*. 1996; 23: 205-9.
- Shindo M, Di Bisceglie AM, Silver J, Limjoco T, Hoofnagle JH, Feinstone SM. Quantitation of hepatitis C virus RNA in serum using the polymerase chain reaction and a colorimetric enzymatic detection system. *Hepatology*. 1991; 14: 68.
- Shindo M, Bisceglie AM, Cheung L, Shin WK, Cristiano K, Feinstone SM, Hoofnagle JH. Decrease in serum hepatitis C viral RNA during alpha interferon therapy for chronic hepatitis C. *Ann Intern Med*. 1991; 115: 700-4.

Sies H. *Glutathione conjugation mechanisms and biological significance*. London: Academic Press; 1988.

Silva ISS. Estudo da enzima gama-glutamyltransferase na infecção crônica pelo vírus da hepatite C [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina; 1999.

Simmonds P, Holmes EC, Cha T-A, Chan S-W, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol*. 1993; 75: 2391-9.

Simmonds P, Alberto A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS, Choo QL, Colombo M, Cuypers HTM, Date T, Dusheiko GM, Esteban JI, Fay O, Hadziyanis SJ, Han J, Hatzakis A, Holmes EC, Hotta H, Houghton M, Irvine B, Kohara M, Kolberg JA, Kuo G, Lau JYN, Lelie PN, Maertens G, McOmish F, Miyamura T, Mizokami M, Nomoto A, Prince AM, Reesink HW, Rice C, Roggendorf M, Schalm SW, Shikata T, Shimotohno K, Stuyver L, Trépo C, Weiner A, Yap PL, Urdea MS. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes [letter]. *Hepatology*. 1994; 19: 1321-4.

Simmonds, P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology*. 1995; 21: 570-81.

Sloan-Lancaster J, Evavold B, Allen P. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand. *Nature*. 1993; 363: 156-9.

Soto B, Sanchez-Quijano A, Rodrigo L, Del Olmo JA, Garcia-Bengoechea M, Hernandez-Quero J, Rey C, Abad MA, Rodriguez M, Sales Gilabert M, Gonzalez F, Miron P, Caruz A, Relimpio F, Torronteras R, Leal M, Lisen E. Human Immunodeficiency Virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with unusually rapid progression to cirrhosis. *J Hepatol*. 1997; 26: 1-5.

Stuyver L, Fretz C, Esquivel C, Boudifa A, Jaulmes D, Azar N, et al. HCV genotype analysis in apparently healthy anti-HCV positive Parisian blood donors. *Transfusion*. 1996; 36 (6): 552-8.

Stuyver L, Wyseur A, Rombout A, Louwagie J, Scarcez T, Verhofstede C, et al. Line probe assay for rapid detection of drug-selected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 284-91.

Suarez M, Beloqui O, Ferrer JV, Gil B, Qian C, Garcia N, Civeira P, Prieto J. Glutathione depletion in chronic hepatitis C. *Hepatol Commun*. 1993; 1: 215-21.

Takano S, Yokosura O, Imazeki F, Tagawa M, Omata M. Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C: a prospective study of 251 patients. *Hepatology*. 1995; 21: 650-5.

Takikaea S, Ishii K, Aikazaki H. Cell fusion activity of HCV envelope proteins. In: 6th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, Washington; 1999.

Takimoto M, Ohkoshi S, Ichida T, Takeda Y, Nomoto M, Asakura H, Naito A, Mori S, Hata K, Igarashi K, Hara H, Ohta H, Soga K, Watanabe T, Kamimura T. Interferon inhibits progression of liver fibrosis and reduces the risk of hepatocarcinogenesis in patients with chronic hepatitis C: a retrospective multicenter analysis of 652 patients. *Dig Dis Sci*. 2002; 47 (1): 170-6.

Tanaka E, Ohue C, Aoyagi K, Yamaguchi K, Yagi S, Kiyosawa K, Alter JH. Evaluation of a new enzyme immunoassay for hepatitis C virus (HCV) core antigen with clinical sensitivity approximating that of genomic amplification of HCV RNA. *Hepatology*. 2000; 32: 388-93.

- Taylor D R, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV protein. *Science*. 1999; 285: 107-10.
- Tengan FM, Eluf-Neto J, Cavaleiro NP, Barone AA. Sexual transmission of hepatitis C virus. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2001; 43(3): 133-7.
- Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, Shih JW, Galai N, Carella AV. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending Baltimore sexually transmitted disease clinics – analysis of 309 Sex partnerships. *J Infect Dis*. 1995; 171: 768-85.
- Thornburn D, Bird GLA, Spence E, Macsween RNM, Mills PR. Alpha-glutathione-S-transferase levels in chronic hepatitis C infection and the effect of alpha-interferon therapy. *Clin Chim Acta*. 1996; 253 (1-2): 171-80.
- Tilg H, Wilmer A, Vogel W. Serum levels of cytokines in chronic liver disease. *Gastroenterology*. 1992; 103: 264-74.
- Tong MJ, El Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med*. 1995; 332: 1463-5.
- Trull A, Boyce S, Facey S, et al. GST: an early marker of liver rejection [abstract]. *J Hepatol*. 1992; 16(suppl 1): S18.
- Trull AK, Facey SP, Rees GW, Wight DGD, Jamieson GN, Joughin C, Friend PJ, Alexander GJM. Serum alpha-glutathione S-transferase - a sensitive marker of hepatocellular damage associated with acute liver allograft rejection. *Transplantation*. 1994; 58: 1345-51.
- Urdea M.S. Branched DNA signal amplification. *Biol Technol*. 1994; 12: 926-8.
- Van Der Poel CL, Cuypers HPM, Reesink HW, Weiner AJ, Quan A, Di Nello R, Van Boden JJP, Winkel I, Mulder-Folkers D, Exel-Oehlers PJ,

Schaasberg W, Leentvaar-Kuypers A, Polito A, Houghton M, Leite PN. Confirmations of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet*. 1991; 337: 317-9.

Van Der Poel CL, Cuypers HT, Reesink HW. Hepatitis C virus six years on. *Lancet*. 1994; 344: 1475-9.

Van Doorn, L-J. Review molecular biology of the hepatitis C virus. *J Med Virol*. 1994; 43: 345-56.

Van Thiel, DH, Friedlander L, Malloy P, Wright HI, Gutrakar A, Fagiuoli S, Irish W. γ -glutamyl transpeptidase as a response predictor when using α -interferon to treat hepatitis C. *Hepatogastroenterology*. 1995; 42: 888-92.

Vaubourdolle M, Chazouilleres O, Briaud I, Legendre C, Serfaty L, Poupon R, Giboudeau. Plasma alpha-glutathione-S-transferase (ALPHA-GST) as a marker of liver-damage in patients with chronic hepatitis-C. *Gastroenterology*. 1994; 106: (4 Suppl) A1003.

Vaubourdolle M, Chazouilleres O, Briaud I, Legendre C, Serfaty L, Poupon R, Giboudeau J. Plasma alpha-glutathione-S-transferase assessed as a marker of liver-damage in patients with chronic hepatitis-C. *Clin Chem*. 1995; 41 (12): 1716-9.

Vaubourdolle M, Chazouilleres O, Serfaty L, Okandze A, Poupon R, Giboudeau J. Interest of alpha-glutathione-S-transferase (ALPHA-GST) plasma determination in patients with chronic hepatitis-C and persistently normal ALT activity. *Gastroenterology*. 1995; 108 (4 Suppl): A1194.

Vaubourdolle M, Chazouilleres O, Serfaty L, Okandze A, Poupon R, Giboudeau. α -glutathione-S-transferase (ALPHA-GST) plasma determination

in follow-up of interferon therapy in chronic hepatitis-C. *Gastroenterology* 1996; 110: (4) A1353.

Verbaan H, Widell A, Bondeson L, Andersson K, Eriksson S. Factors associated with cirrhosis development in chronic hepatitis C patients from an area of low prevalence. *J Viral Hepat.* 1998; 5 (1): 43-51.

Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, Cohn S, Thomas DL. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology.* 1999; 29: 908-14.

Ward S, Lauer G, Isba R, Walker B, Klenerman P. Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base. *Clin Exp Immunol.* 2002; 128 (2) 195-203.

Wasley A, Alter M. Epidemiology of hepatitis C: Geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis.* 2000; 20:1-16.

Weiland O, Sharcz R. Hepatitis C: virology, epidemiology, clinical course and treatment. *Scand J Gastroenterol.* 1992; 27: 33-42.

Weiner HL, Friedman A, Miller A, Khoury JS, Al-Sabbagh A, Santos L, Sayegh M, Nussenblatt RB, Trentham DE, Hafler DA. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12: 809-37.

Westin J, Nordlinder H, Lagging M, Norkrans G, Wejstal R. Steatosis accelerates fibrosis development over time in hepatitis C virus genotype 3 infected patients. *J Hepatol.* 2002; 37: 837-42.

- WHO. Global surveillance and Control of hepatitis C. Report of a WHO consultation organized in collaboration with the viral hepatitis prevention board. Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat.* 1999; 6: 35-47.
- Widell A, Molnegren V, Pieksma F, Calmann M, Peterson J, Lee S. Detection of hepatitis C core antigen in serum or plasma as a marker of hepatitis C viraemia in the serological window-phase. *Transfus Med.* 2002; 12 (2): 107-13.
- Winckler MA, Balsar AM, Carvalho VF, Albuquerque GC, Fernandes MS, Borges IVH, Machado MCA, Rabel MR. HCV antibodies in blood donors in Public Hospital. *Rev Paul Med.* 1992; 110 (supl 5): abstract TTD-62.
- Wong V, Caronia S, Wight D, Palmer CR, Petrik J, Britton P, Alexander GJM. Importance of age in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 1997; 4: 255-64.
- Wright TL, Hsu H, Donegan E, Feinstone S, Greenberg H, Read A, Ascher NL, Reberts JP, Lake JR. Hepatitis C virus was not found in fulminant non-A, non-B hepatitis. *Ann Intern Med.* 1991; 115: 111-2.
- Yanagi MST, Claire M, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. In vivo analysis of the 3'untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infection cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 2291-5.
- Yoo BJ, Spaette RR, Geballe AP, Selby M, Houghton M, Han JH. 5'end-dependent translation initiation of hepatitis C viral RNA and the presence of putative positive and negative translation initiation of hepatitis C viral RNA and the presence of putative positive and negative translation control elements within the 5'untranslated region. *Virology.* 1992; 191: 889-99.

Yoshihara M, Sekiyama K, Sugata F, Okamoto H, Mayumi M. Persistence of HCV replication in Non-A, Non-B fulminant viral hepatitis. *Gastr Jpn.* 1991; 26:235.

Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itou Y, Takayanagi M, et al. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- α therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology.* 1992; 16: 293-9.

Zeuzem S, Schmidt JM, Lee JH, Ruster B, Roth WK. Effect of interferon alpha on the dynamics of hepatitis C virus turnover in vivo. *Hepatology.* 1996; 23: 366-71.

Zhao ZZ, Savage NW, Sugerman PB, Walsh LJ. Mast cell/T cell interactions in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2002; 31 (4): 189-95.

Zibert A, Meisel H, Kraas W, Schulz A, Jung G, Roggendorf M. Early antibody response against hypervariable region 1 is associated with acute self-limiting infections of hepatitis C virus. *Hepatology.* 1997; 25: 1245-9.

Zignego AL, Brchot C. Extra-hepatic manifestations of HCV infection: acts and controversies. *J Hepatol.* 1999; 31: 369-76.