ANA LÚCIA BERNARDES DA SILVA

O papel das mutações do gene *HFE* e da sobrecarga
de ferro na evolução da hepatite crônica pelo VHC

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica

Orientadora: Dra. Marta Mitiko Deguti

SÃO PAULO
2009

“La fixité du milieu intérieur est la condition d'une vie
libre et indépendante”

*(A constância do ambiente interior é a condição para uma vida livre e
independente)*

Claude Bernard, 1878

Dedico

A Deus...

Aos meus queridos pais Antonio (*in memorian*) e Luzia, que me conferiram base e referência para trilhar os caminhos da vida.

Aos meus irmãos Fábio e Danilo pelo apoio e ajuda.

Ao meu sobrinho Davi por existir e iluminar nossa vida.

Ao meu querido esposo Paulo, que sempre me incentivou e apoiou, mesmo nos momentos mais difíceis pelos quais passamos juntos, por seu amor, seu carinho e compreensão...Por você existir e fazer a diferença.

AGRADECIMENTOS

A Marta Mitiko Deguti, minha orientadora e amiga, por ter dedicado horas preciosas...Obrigada pela oportunidade, pela confiança e por me aceitar como sua primeira orientanda. Desempenhando um papel além de orientadora, sempre me incentivou e me apoiou nas dificuldades encontradas. Proporcionando ferramentas para meu crescimento científico e pessoal. Muito obrigada.

Ao Prof. Marcel Cerqueira César Machado, pelo estímulo contínuo e irrestrito, impulsionando o meu início na pesquisa científica.

A Márcia Saldanha Kubrusli, pelos seus ensinamentos em técnico e científico, grande incentivadora e colaboradora desta dissertação.

Ao Prof. Flair José Carrilho pela oportunidade, apoio e incentivo.

Ao Prof. Luiz Augusto D'Albuquerque Carneiro pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Telésforo Bacchella pela amizade e incentivo, meu agradecimento.

A Dr. João Renato pela oportunidade, apoio e incentivo.

Ao Dr. Edson Abdala, pelo seu incentivo e colaboração científica, pelo carinho e amizade, obrigada.

Ao Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado por contribuir pela sua contribuição científica, apoio e incentivo.

A Dra Suzete Notaroberto pelo colaboração na seleção e coleta de dados.

Ao Dr. Raymundo Soares de Azevedo Neto, pelas manhãs de segundas-feiras, dedicados à análise estatística, obrigada pelo apoio e incentivo desde o início desse projeto.

A Dra Suzane Kioko Ono-Nita, pela sua colaboração disponibilizando o banco de dados da soroteca e a coleta dos pacientes no ambulatório.

À Helena Scavone Paschoale, Fernanda Rocha Barbosa, Carolina Santiago Aguilar, Camila da Silva Ferreira, Marcelo Moreira Tavares de Souza, Paulo Dominguez Nasser na coleta dos pacientes, vocês foram fundamentais na constituição da casuística dessa dissertação, muito obrigada.

A Dra Andréia Evangelista pela sua colaboração e apoio, obrigada.

Aos queridos amigos do transplante de fígado: André Cosme Oliveira , Estela Figueira, Fábio Ferreira Makdissi, Flavio Galvão, Joel Avancini Rocha Filho, João Plínio Rocha, Maurício Fernando A. Barros, Ricardo Nani, Rodrigo Bronze, Vinicius Rocha Santos, Wellington Andraus, Genilton Serejo Mesquita, Isabel Leal, Doroteia Silva Freitas, Isamilda Firmino da Silva, Marco Antonio de Paulo Júnior, Natali Nathane da Silva, Rita Ruschioni de Oliveira, Silvana Figueiredo Guido pela amizade, apoio e incentivo.

Aos meus colegas de trabalho e amigos da equipe de enfermagem do transplante de fígado Adriana Cortez, Andreza de Moraes, Cristiane Silva de Souza, Daniela Siqueira de Campos, Jézio Vieira de Carvalho, Karina Tiemi Osaki, Márcia Gonçalves de A. Silva,

Maria da Graças David, Maria Patrícia Silva, Maria Pereira Assis Feitosa, Rosilda Nunes Pontes, Valcinéia Souza Andrade Gaspar, Valdecy Miranda Barbosa pela colaboração na coleta dos pacientes, pela amizade, apoio e incentivo.

A Mariliza Ottani Fernandes e Daniela Smid pela dedicação com que realizam seu trabalho, pela colaboração e apoio.

Ao Vitor Alonso Gonçalves pelo suporte de informática nas horas de sufoco, pelo seu apoio e incentivo.

As secretárias Fátima Gomes, Fabiana Soares Bispo e Cláudia Arruda pelo paciência e dedicação.

Ao funcionários da secretaria do ambulatório de hepatites pela paciência e colaboração no levantamento de pacientes e prontuários.

Ao Genivaldo Silva querido amigo, sempre presente nos momentos difíceis, muito obrigada.

A Clarice Lemos Abrantes, Maria Cristina Nakhle e Thiago Ferreira Araújo meus querido amigos, pela colaboração nas análises das amostras e padronização da técnica de real time, muito obrigada.

A Juliana Cristina Pereira pela sua dedicação me ajudando na revisão dos prontuários, organização da ficha dos pacientes e do material biológico.

A Ivone Aparecida Ferreira da Silva, pela ajuda na coleta de amostras e levantamentos da soroteca.

A Alcione Sanchez de Alexandre minha colega de trabalho e amiga, que sempre presente me apoiou e incentivou, por ter dedicado

várias horas do seu dia, fazendo levantamento e cadastramento dos pacientes. Muito obrigada, esta dissertação também é sua!

As colegas de trabalho Ana Maria De Mendonça Coelho, Nilza Aparecida Trindade Molan, Sandra Nassa Sampietre, pelo apoio e incentivo.

A Maria Inês de Oliveira, amiga sempre presente, muitas vezes me ofereceu colo, obrigada.

A Rosa Cássia dos Santos Santoja amiga de todas as horas, grande incentivadora e colaboradora.

A Cinthia Lanchotte que apesar de nosso pouco tempo de convivência me incentivou, apoiou e muito colaborou, obrigada.

Ao Sérgio Pinheiro Ribeiro pela colaboração e prontidão com que sempre me auxiliou, obrigada.

A todos os funcionários e amigos dos laboratórios LIM 06 e 07, por me abrirem as portas e disponibilizarem os equipamentos, pela grande ajuda nas análises e pela amizade.

Aos ambulatórios de Hepatites e Transplante de Fígado, a todos os médicos destes serviços que encaminharam pacientes para este estudo.

A Profa Aparecida Basile pessoa maravilhosa que tive a honra de conhecer e conviver por um curto período de tempo. Você contribuiu para meu crescimento pessoal e profissional, muito obrigada.

A todos os pacientes e familiares que, dia a dia, surpreendem-me com sua sabedoria e garra na luta pela vida e pela possibilidade de ensinar-me a lidar com o ser humano da melhor maneira possível.

A minha família meu marido Paulo, minha mãe Luzia, meu pai Antonio (*in memorian*), meus irmãos Fábio e Danilo, meus cunhados, meus sogros, meus sobrinhos, minha maior estrutura, o significado da solidez, todos incentivadores e grandes apoios na minha profissão.

Aos funcionários da biblioteca FMUSP pelo carinho e dedicação como fazem o seu trabalho.

SUPORTE FINANCEIRO

USP/FM/PROAP/PROG CGPP 021/2006 GASTRO

- insumos laboratoriais para a técnica de PCR em tempo real

LIM 37 – verba de apoio à pesquisa científica

- insumos laboratoriais

Alves de Queiroz Family Fund

- insumos laboratoriais, infra-estrutura para coleta e armazenamento de soro e DNA

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos
Lista de tabelas
Lista de figuras
Resumo
Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A Hepatite Crônica pelo VHC	2
1.2	Metabolismo do Ferro, Hemocromatose Hereditária (HH) e o Gene <i>HFE</i>	4
1.3	Sobrecarga de Ferro como Fator Agravante da Hepatite Crônica pelo VHC	7
1.4	Hipótese	15
1.5	Objetivos	15
2	Casuística e Métodos	16
2.1	Casuística	17
2.1.1	Critérios de Inclusão	17
2.1.2	Critérios de Exclusão	17
2.1.3	Seleção da Casuística	17
2.1.4	Aspectos Éticos	18
2.2	Métodos	18
2.2.1	Coleta de Dados Clínicos, Laboratoriais e Anátomo- Patológicos	18
2.2.2	Caracterização dos Parâmetros Coletados	19

2.2.3	Pesquisa das Mutações no Gene <i>HFE</i>	20
2.2.3.1	Infra-Estrutura	20
2.2.3.2	Extração e Análise do DNA Genômico	21
2.2.3.3	Pesquisa de Mutações C282Y e H63D pela Técnica de PCR em Tempo Real	22
2.2.4	Análise Estatística	23
2.2.4.1	Análise Bivariada	24
2.2.4.2	Análise Multivariada por Regressão Logística Binomial	25
2.2.4.3	Grupo Caso-Controle: Constituição e Análise Estatística	25
3.	Resultados	26
3.1	Dados Clínicos, Laboratoriais e Anátomo-Patológicos	27
3.2	Genotipagem <i>HFE</i> para Mutações C282Y e H63D por método de PCR em Tempo Real	36
3.3	Resultados da Análise Estatística	39
3.3.1	Resultados das Análises Bivariadas	39
3.3.2	Análise Multivariada por Regressão Logística	44
3.3.3	Resultados da Análise Bivariada no Grupo Caso-Controle	44
3.3.4	Análise Multivariada Logística do Grupo Caso-Controle	49
4	Discussão	50
5	Conclusões	60

6	Anexos	62
6.1	Aprovação do Protocolo na Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do HC-FMUSP	63
6.2	Aprovação do Protocolo de Pesquisa na Comissão de Ética do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP	64
6.3	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	65
6.4	Lista dos Casos, Parâmetros Coletados e Resultados de Genotipagem	66
6.4.1	Lista de Casos, Características Demográficas e Clínicas	66
6.4.2	Resultados de Fibrose, Sobrecarga Bioquímica e Tecidual de Ferro e Genotipagem	78
6.5	Constituição do Grupo Caso-Controle	90
7	Referências	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
CAPPesq	Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa
CHC	Carcinoma hepatocelular
CTF	Concentração de ferro tecidual
EDTA	Ácido tetracético etilenodiamina
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
DNTPS	Desoxinucleotídeos trifosfatado
FICT	<i>Free informed consent term</i>
GGT	Gama glutamil transferase
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HLA	Antígeno leucocitário de histocompatibilidade
HH	Hemocromatose hereditária
IMC	Índice de massa corpórea
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
pb	pares de base
PCR	Reação de polimerase em cadeia
RNA	Ácido ribonucleíco
RT	Tempo real
Sat Fe	Saturação de transferrina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TfR1	Receptor da transferrina 1
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
~	aproximadamente
%	porcentagem
>	maior que

<	menor que
≥	maior ou igual
°C	graus Celsius
g	grama
kg	quilo
M	metro
μL	microlitro
Min	minuto
RPM	rotações por minuto
S	segundos

LISTA DE TABELAS

1.1	Hepatite Crônica pelo VHC, Sobrecarga de Ferro e Mutações no Gene <i>HFE</i> : Principais Achados das Publicações Indexadas no Banco de Dados Pubmed	13
2.1	Descrição das Mutações <i>HFE</i> C282Y e H63D	23
3.1.1	Idade, IMC e Parâmetros Bioquímicos de Ferro dos Portadores de Hepatite Crônica VHC Segundo Gênero	30
3.3.1.1	Parâmetros Epidemiológicos e Clínicos Correlacionados com a Evolução da Fibrose Hepática em Portadores de Hepatite Crônica VHC: Análise Bivariada	39
3.3.1.2	Siderose Bioquímica e Tecidual Correlacionadas com a Evolução da Fibrose Hepática em Portadores de Hepatite Crônica VHC: Análise Bivariada	40
3.3.1.3	Mutações <i>HFE</i> Correlacionadas com a Evolução da Fibrose Hepática em Portadores de Hepatite Crônica VHC: Análise Bivariada	41
3.3.1.4	Siderose Bioquímica e Tecidual Correlacionadas com Presença de CHC em Portadores de Hepatite Crônica VHC: Análise Bivariada	42
3.3.1.5	Mutações <i>HFE</i> Correlacionadas com Presença de CHC em Portadores de Hepatite Crônica VHC: Análise Bivariada	43
3.3.2.1	Variáveis Associadas a Evolução da Fibrose Hepática em Portadores de Hepatite Crônica VHC: Análise Multivariada por Regressão Logística	44
3.3.3.1	Parâmetros Epidemiológico e Clínico Correlacionados com a Evolução da Fibrose Hepática no Grupo Caso-Controlle em Portadores de Hepatite Crônica VHC: Análise Bivariada	45
3.3.3.2	Níveis de Siderose Bioquímica e Tecidual Correlacionadas com a Evolução da Fibrose Hepática em Portadores de Hepatite Crônica VHC: Análise Bivariada no Grupo Caso-Controlle	46

3.3.3.3	Presença de Mutações <i>HFE</i> Correlacionadas com a Evolução da Fibrose Hepática em Portadores de Hepatite Crônica VHC no Grupo Caso-Control: Análise Bivariada	47
3.3.3.4	Presença de Mutações <i>HFE</i> Correlacionadas com CHC em Portadores de Hepatite Crônica VHC no Grupo Caso-Control: Análise Bivariada	48
3.3.4.1	Variáveis Correlacionadas com Evolução de Fibrose Hepática e CHC em Portadores de Hepatite Crônica VHC no Grupo Caso-Control: Análise Multivariada	49

LISTA DE FIGURAS

3.1.1	Distribuição dos Portadores de VHC Segundo Gênero e Etnia	28
3.1.2	Distribuição dos Portadores de VHC Segundo Gênero e <i>Diabetes Mellitus</i>	28
3.1.3	Distribuição dos Portadores de VHC Segundo Gênero e Etilismo	29
3.1.4	Distribuição dos Níveis Séricos de Ferro em Portadores de VHC Segundo Graus de Fibrose	31
3.1.5	Distribuição dos Níveis Bioquímicos de Saturação de Transferrina em Portadores de VHC Segundo Graus de Fibrose	32
3.1.6	Distribuição dos Níveis Séricos de Ferritina em Portadores de VHC Segundo Graus de Fibrose	32
3.1.7	Distribuição dos Níveis Bioquímicos de Saturação de Transferrina em Portadores de VHC Segundo Número de Alelos da Mutação C282Y	33
3.1.8	Distribuição Níveis Séricos de Ferritina em Portadores de VHC Segundo Número de Alelos da Mutação C282Y e H63D	34
3.1.9	Distribuição Níveis Séricos de Ferritina em Portadores de VHC Segundo Número de Alelos da Mutação H63D	35
3.1.10	Distribuição dos Níveis Séricos de Saturação de Transferrina em Portadores de VHC Segundo Número de Alelos da Mutação H63D	34
3.1.11	Distribuição dos Graus de Fibrose em Portadores de VHC Segundo Gênero	35
3.1.12	Distribuição dos Graus de Siderose em Portadores de VHC Segundo Gênero	35
3.1.13	Distribuição dos Portadores de VHC Segundo Gênero e Carcinoma Hepatocelular	36

3.2.1	Detecção do Polimorfismo C282Y do Gene <i>HFE</i> pela Técnica de PCR em Tempo Real	37
3.2.2	Detecção do Polimorfismo H63D do Gene <i>HFE</i> pela Técnica de PCR em Tempo Real	38

RESUMO

BERNARDES, A.L. **O papel das mutações do gene *HFE* e da sobrecarga de ferro na evolução da hepatite crônica pelo VHC.** São Paulo: [dissertação]. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2009. 100 p.

Introdução: A infecção pelo VHC é uma epidemia de proporções globais, que se torna crônica em cerca de 85% dos indivíduos. Sobrecarga de ferro secundária a mutações *HFE* vem sendo proposta como fator agravante na evolução da hepatite crônica C. **Objetivos:** Avaliar se sobrecarga de ferro, mutações no gene *HFE* estão associadas a progressão da fibrose hepática e a carcinoma hepatocelular (CHC) em portadores crônicos VHC. **Casuística e Métodos:** De um banco de 2300 pacientes matriculados nos Ambulatórios de Hepatologia e de Transplante Hepático do HCFMUSP, selecionaram-se 320 portadores de hepatite crônica C. Os homens (55,6%) apresentaram 50,8 anos de idade em média e as mulheres 54,3. Obtiveram-se dados clínicos e laboratoriais da época da biópsia hepática, admissionais ou com pelo menos um ano de *wash-out* do tratamento antiviral. Considerou-se sobrecarga bioquímica níveis de ferro, saturação da transferrina e ferritina acima dos valores de referência. Sobrecarga de ferro tecidual foi identificada pela coloração de Perl's graus 3-4. As mutações *HFE* C282Y e H63D foram pesquisadas pela técnica de PCR em tempo real, em DNA extraído de sangue total, após assinatura de TCLE aprovado pelo comitê de ética local. A fibrose hepática foi considerada avançada para graus 3-4 da classificação SBH/SBP e Metavir (n=167, 52,2%). CHC foi definido por biópsia ou por imagem típica por 2 métodos e AFP $\geq$ 400 mg/dL (n=45, 14,1%). Investigaram-se antecedentes de etilismo, diabetes mellitus, IMC e esteatose em biópsia hepática. A partir dos resultados de genotipagem *HFE*, constituiu-se um subgrupo caso-controle (n=182) com os portadores de mutações e pares de idade, sexo, etnia e IMC similares. Procederam-se análises de correlação bivariada e multivariada (IC=95%) nos grupos geral e caso-controle. **Resultados:** Quando se compararam casos com fibrose leve vs avançada, observaram-se níveis elevados de ferro em 17,7% vs 25,2% (p=0,019); saturação da transferrina em 24,3% vs 36,7% (p=0,001); ferritina em 25,8% vs 32,4% (p=0,040) e sobrecarga de ferro tecidual em 3,6% vs 1,4% (p=0,126). Quanto à mutação C282Y, observaram-se frequências alélicas de 0,9% vs 2,0% (p=0,110) e à H63D 5,0% vs 8,0% (p=0,033). No subgrupo caso-controle, as associações de C282Y e H63D com fibrose avançada ocorreram com significâncias de p=0,072 e 0,008, respectivamente. A análise multivariada, tendo fibrose como variável dependente

nesse mesmo subgrupo, confirmou as associações com C282Y (OR=31,45; p=0,006) e H63D (OR=33,70; p=0,001). Neste mesmo subgrupo, a presença de pelo menos um alelo mutante esteve associada à ocorrência de CHC (p=0,015). Não se identificaram outros parâmetros associados a transformação carcinomatosa. Na análise multivariada, foram variáveis associadas a evolução da fibrose idade avançada (OR=2,36; p=0,000), etilismo (OR=2,18; p=0,007), saturação da transferrina (OR=2,11; p=0,010) e mutação H63D (OR=1,97; p=0,03). **Discussão e Conclusões:** Houve correlação de graus mais avançados de fibrose com níveis elevados de ferro, saturação da transferrina e ferritina; contudo, esses marcadores também podem estar igualmente elevados nos indivíduos com pouca fibrose. Ao contrário, em muitos casos, a sobrecarga bioquímica de ferro pode ser consequência da progressão da doença hepática, e não sua causa. As mutações H63D e C282Y ocorreram em associação com maiores graus de alteração arquitetural; mas, como não houve associação entre siderose tecidual e fibrose, é possível que seu papel na agressão hepática não ocorra diretamente por meio da sobrecarga de ferro. Os portadores de mutações *HFE* apresentam CHC com maior frequência que seus casos-controle.

Descritores: *HFE*, VHC, hemocromatose hereditária, sobrecarga de ferro, fibrose

SUMMARY

BERNARDES, A.L. **The role of *HFE* gene mutations and iron overload in the history of chronic hepatitis C.** São Paulo: [dissertation]. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2009. 100 p.

Introduction: HCV infection is an epidemic of global proportions, which becomes chronic in about 85% of individuals. Iron overload due to *HFE* mutations has been proposed as aggravating factor in the evolution of chronic hepatitis C. **Objectives:** To assess whether iron overload, mutations in the *HFE* gene are associated with progression of liver fibrosis and hepatocellular carcinoma (HCC) in chronic HCV. **Patients and Methods:** From a database of 2300 patients enrolled in the outpatient clinics of Hepatology and Liver Transplantation, HCFMUSP, 320 patients with chronic hepatitis C were selected. Men (55.6%) were 50.8 years old on average and women 54.3. Admissional clinical and laboratory data at the time of liver biopsy were obtained; when patient had been previously treated with antiviral drugs, the wash-out period required was of at least one year. Biochemical iron overload was defined as iron, ferritin and transferrin saturation above the reference values. Tissue iron overload was identified by Perls staining of grades 3-4. The *HFE* C282Y and H63D mutations were searched by real-time PCR technique in DNA extracted from whole blood, after signing of FICT approved by the local ethics committee. The liver fibrosis was considered advanced for grades 3-4 in the classification SBH/SBP and METAVIR (n = 167, 52.2%). HCC was defined by biopsy or by typical image by 2 methods and AFP $\geq$ 400 mg / dL (n = 45, 14.1%). Personal history of alcoholism, diabetes mellitus, BMI and steatosis in liver biopsy were obtained. A case-control group was constituted based on the results of *HFE* genotyping (n = 182), subjects were paired by age, gender, ethnicity and BMI. Bivariate correlation and multivariate analysis (CI = 95%) groups in general and case-control were carried-out. **Results:** When comparing patients with mild vs advanced fibrosis, biochemical high levels of iron were detected in 17.7% vs 25.2% (p = 0.019), transferrin saturation in 24.3% vs 36.7% (p = 0.001), ferritin in 25.8% vs 32.4% (p = 0.040) and tissue iron overload in 3.6% vs 1.4% (p = 0.126). Regarding to *HFE* mutations, the allelic frequencies of C282Y were 0.9% vs 2.0% (p = 0.110); and of H63D, 5.0% vs 8.0% (p = 0.033). In case-control group, associations of C282Y and H63D with advanced fibrosis occurred with significance of p=0.072 and 0.008, respectively. Multivariate analysis with fibrosis as the dependent variable in that group, confirmed the associations with C282Y (OR = 31.45, p = 0.006) and H63D (OR = 33.70, p = 0.001). In

this same subgroup, the presence of at least one mutant allele was associated with occurrence of HCC ($p = 0.015$). There were not any other parameters found in association with carcinomatous transformation. The multivariate analysis using fibrosis as dependent variable showed association with age (OR = 2.36, $p = 0.000$), alcoholism (OR = 2.18, $p = 0.007$), transferrin saturation (OR = 2.11, $p = 0.010$) and H63D mutation (OR = 1.97, $p = 0.03$). **Discussion and Conclusions:** Advanced degrees of fibrosis were correlated with high levels of iron, transferrin saturation and ferritin; however, these markers can also be elevated in individuals with slight fibrosis. In contrary, in many cases, the biochemistry of iron overload may be a consequence of progression of liver disease. C282Y and H63D mutations occurred in association with more advanced fibrosis. However, as there was not any correlation between tissue siderosis and fibrosis, it might be possible that liver injury occurs not by the iron overload pathway. Finally, carriers of *HFE* mutations were found with HCC more frequently than their case-control.

Descriptors: *HFE*, HCV, hereditary hemochromatosis, iron overload, fibrosis

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Hepatite Crônica pelo VHC

Estima-se que 170 milhões de indivíduos estejam infectados pelo vírus da hepatite C (VHC) no mundo (McHutchison, 2004). No Brasil, a hepatite C também assume proporções epidêmicas e, atualmente, está entre as questões prioritárias do Ministério da Saúde do Governo Federal, por meio do Programa Nacional para a Prevenção e o Controle das Hepatites Virais (PNHV). Na década passada, um estudo epidemiológico conduzido na grande São Paulo estimou prevalência de 1,42% de infectados, grande parte desses ainda assintomáticos (Focaccia *et al.*, 1998). Um estudo multicêntrico brasileiro de 2004 avaliando retrospectivamente 4.996 pacientes portadores de VHC tratados com interferon e ribaverina, avaliando dados demográficos e antropométricos e distribuição dos genótipos, encontrou média de idade dos pacientes de 46 anos, predomínio do sexo masculino (62%) e brancos (80%). O genótipo 1 foi predominante (64%), a média do peso foi 70,6kg e 65% pesava menos de 77kg. Concluíram que isto pode ter um impacto fármacoeconômico positivo no tratamento do genótipo 1 (Focaccia *et al.*, 2004).

No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), os portadores crônicos do VHC já correspondem à maior parcela dos hepatopatas entre os cerca de dois mil indivíduos atendidos mensalmente nos ambulatórios de Transplante de Fígado e de Gastroenterologia Clínica.

De maneira geral, a fase aguda da infecção pelo VHC ocorre silenciosamente. Os testes de detecção do RNA do VHC podem estar positivos dentro do período de 1 a 3 semanas após a infecção e 90%, irá apresentar sorologia ELISA reagente após 3 meses da exposição. Em 50 a 85% dos casos, a infecção vai se tornar crônica. Esses indivíduos ficam expostos ao risco de desenvolver manifestações hepáticas, extra-hepáticas bem como alterações sistêmicas do metabolismo (Poynard *et al.*, 2000).

Múltiplos fatores estão relacionados com a cronificação da infecção e com a gravidade de evolução da doença hepática pelo VHC, tais como diversidade de *quasispecies* virais induzidas durante a infecção aguda; resposta tumoral tardia do hospedeiro contra a proteína viral E2, perfil étnico e de HLA. As células T exercem um papel central no controle e clareamento virais, e acredita-se que mais aspectos da resposta imune adaptativa, o papel dos anticorpos na proteção e o mecanismo de ação da imunidade humoral possam estar envolvidos (Drakesmith and Prentice, 2008).

O VHC é letal quando leva a cirrose, o estágio final da fibrose hepática, o que ocorre em média após 30 anos. O CHC também é uma complicação grave adicional da cirrose pelo VHC (Hoofnagle, 1997; Massard *et al.*, 2006). Acredita-se que a expectativa de vida média dos infectados seja, em 33% dos casos, inferior a 20 anos (Massard *et al.*, 2006). Diversos fatores estão claramente associados com a taxa de progressão da fibrose, como tempo de infecção, idade,

sexo masculino, etilismo, co-infecção pelo HIV. Mais recentemente, esteatose hepática, sobrepeso e diabetes mellitus também vêm sendo reconhecidas como cofatores independentes (Burra, 2009;Massard *et al.*, 2006;Shedlofsky, 1998;Yano, M. *et al.*, 1996).

A sobrecarga de ferro, associada ou não a mutações no gene *HFE*, também vem sendo proposta como fator agravante na evolução da fibrose hepática e no desenvolvimento de CHC, em portadores crônicos VHC (Arber *et al.*, 1994;Fujita and Takei, 2007;Gehrke *et al.*, 2003;Trinder *et al.*, 2008).

1.2 Metabolismo do Ferro, Hemocromatose Hereditária (HH) e Gene *HFE*

O ferro é um elemento paradoxal, indispensável a toda a forma de vida, essencialmente por assegurar o transporte de oxigênio, participa da síntese de DNA, catalisa reações de transferência de elétrons,mas é igualmente tóxico em razão de sua capacidade de catalisar reações oxidativas, e da produção de radicais livres (Nelson, N., 1999;Waheed *et al.*, 1997).

A hepcidina, hoje reconhecida como “hormônio do ferro”, é responsável pela manutenção da homeostase do ferro no organismo. O aumento na produção de hepcidina bloqueia a atividade da ferroportina em macrófagos e enterócitos, que leva ao acúmulo de ferro no sistema reticulo endotelial e reduz a quantidade de ferro absorvido da dieta. Ao contrário, sob condições de baixo fluxo de ferro e anemia, a síntese de hepcidina é suprimida e o ferro é liberado dos

estoques celulares e absorvido da dieta (Nemeth and Ganz, 2006). A hepcidina, também uma proteína de fase aguda, é sintetizada em condições inflamatórias pelas vias da interleucina-6 e do receptor *toll-like-4* (Nemeth and Ganz, 2006). Outro estudo mostra que a expressão da hepcidina no fígado é um fator independente da inflamação na hepatite C (Aoki *et al.*, 2005).

A mutação C282Y torna a proteína incapaz de se associar a β 2-microglobulina, que é responsável pelo seu transporte e inserção na membrana celular. Sua ausência na membrana acarreta um aumento da afinidade do receptor da transferrina, o que resulta em maior absorção de ferro. A mutação H63D também reduz a afinidade do receptor de transferrina (Griffiths and Cox, 2000).

A hemocromatose hereditária (HH), caracterizada pela sobrecarga de ferro secundária à disfunção da proteína HFE (Feder *et al.*, 1996) é uma das condições de herança autossômica recessiva mais comuns no Ocidente. Fisiologicamente, a proteína HFE liga-se ao receptor de transferrina, modulando sua afinidade pelo ferro. Estas proteínas são expressas na membrana basolateral dos enterócitos duodenais (Waheed *et al.*, 1999). Recentes estudos com modelos experimentais animais de HH sugerem papel crucial para o HFE como sensor de ferro do hepatócito e estimulador da hepcidina. A atividade de sinalização do HFE silencia-se quando esta se liga ao receptor da transferrina 1 (TfR1) (Pantopoulos, 2008).

Na HH, mutações *HFE* levam a expansão do ferro plasmático precoce e progressiva absorção duodenal excessiva. O metal excedente acumula-se no parênquima de órgãos como o fígado, pâncreas e coração, acometendo suas funções ao longo do tempo (Vautier and Olynyk, 2000; Waheed *et al.*, 1999).

Clinicamente, pode haver o desenvolvimento de *diabetes mellitus*, cardiopatia, artrite, hipogonadismo, pigmentação diferenciada da epiderme, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (CHC) (Waheed *et al.*, 1997). Essas manifestações ocorrem caracteristicamente na idade adulta, e nas mulheres surgem em idades mais avançadas do que nos homens (Powell *et al.*, 2000).

O genótipo C282Y homozigoto, responsável pela forma clássica da doença, ocorre em 0,44% dos brancos não-hispânicos, 0,027% dos hispânicos e 0,014% dos negros, sendo praticamente inexistente nos asiáticos. Outro genótipo também associado a HH, C282Y/H63D heterozigoto composto, ocorre em 2% dos brancos não-hispânicos, 0,33% dos hispânicos, 0,071% dos negros e em 0,0055% dos asiáticos (Adams *et al.*, 2005). O papel do genótipo H63D homozigoto no desenvolvimento da HH não foi demonstrado (Gochee *et al.*, 2002). Estima-se que as frequências alélicas das mutações C282Y e H63D em brasileiros varie de 0,5 a 1,4% e 6,4 a 20,3%, respectivamente, de acordo com o grupo étnico (Agostinho *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2001).

Recentemente, tem se atribuído à mutação C282Y maior risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Blanc *et al.*,

2000; Nahon *et al.*, 2008; Pirisi *et al.*, 2000), informação contestada por outros autores (Boige *et al.*, 2003).

A sobrecarga de ferro em portadores de HH atua de maneira determinante na evolução de fibrose e de cirrose hepática (Loreal *et al.*, 1992), por meio de produção de radicais livres como hidroxil e ferril (Caraceni *et al.*, 1994) e de ativação lipídica (Britton *et al.*, 1987). Além disso, a sobrecarga de ferro participa do processo de carcinogênese hepática nesses pacientes (Hellerbrand *et al.*, 2003).

1.3 A Sobrecarga de Ferro como Fator Agravante da Hepatite Crônica pelo VHC

Desde que Di Bisceglie *et al.* descreveu, pela primeira vez, em 1992, que a hepatite crônica C cursa com níveis elevados de ferro e índices de ferro hepático, diversos outros grupos de pesquisadores têm reconhecido e estudado essas associações (Tabela 1). Uma recente enquete nacional norte-americana, intitulada *Third National Health and Nutrition Examination Survey*, demonstrou que indivíduos com VHC possuem níveis de ferro e ferritina mais elevados que os indivíduos saudáveis, bem como os níveis de AST, ALT, GGT e saturação de transferrina. Observaram, ainda, que nesse mesmo grupo de portadores VHC, os níveis de ferro e ferritina são particularmente mais elevados em indivíduos do sexo masculino e de etnia negra, em comparação com mulheres e com brancos (Shan *et al.*, 2005).

Cerca de 30 a 40% dos portadores crônicos VHC apresentam elevação dos níveis séricos de saturação de transferrina e ferritina ou aumento da concentração hepática de ferro, principalmente nos pacientes em estágio avançado de hepatite crônica (Fujita *et al.*, 2007; Guyader *et al.*, 2007; Nahon *et al.*, 2008). Dados similares também foram demonstrados em estudo envolvendo universidades estaduais paulistas, tendo-se identificado que portadores de hepatite crônica pelo VHC cursam com elevação do ferro sérico em 28%, da ferritina 27% e de saturação da transferrina em 12,5%. Já a deposição de ferro em tecido hepático, com coloração de Perls, ocorre em 15,6%, sendo que em graus 2 e 3 em apenas 7%, e em concordância com um índice de concentração hepática >30 mmol/g peso seco em apenas 5% dos casos (Silva, I. S. *et al.*, 2005).

Inúmeros estudos observacionais e estudos prospectivos demonstraram que a sobrecarga de ferro hepático agrava a evolução da fibrose (Bonkovsky *et al.*, 2002; Fujita *et al.*, 2007; Geier *et al.*, 2004; Shan *et al.*, 2005) e também influenciam negativamente na resposta ao tratamento antiviral (Fontana *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2007; Griffiths, A. and Olynyk, 2002; Lebray *et al.*, 2004; Olynyk *et al.*, 1995; Yano, K. *et al.*, 2004). Contudo, essa mesma correlação não foi estabelecida por outros grupos que conduziram estudos semelhantes (Lebray *et al.*, 2004; Thorburn *et al.*, 2002). Também Silva *et al.*, 2005 não constataram relação entre concentração de ferro em tecido hepático e gravidade histológica, mas apenas com o sexo masculino,

níveis de ferritina e graus de intensidade à coloração de Perls maiores.

A controvérsia prossegue quando se questiona o papel de mutações *HFE* na sobrecarga de ferro de portadores crônicos VHC, na resposta ao tratamento antiviral, na evolução da fibrose. Autores como Smith et al., 1998 e Bonkovsky et al., 2002 propuseram que heterozigotos de mutações no gene *HFE*, por possuírem graus intermediários de sobrecarga de ferro, seriam susceptíveis a lesões hepáticas mais graves quando infectados pelo VHC. Corroborando esta tese, pesquisadores de países nórdicos observaram que portadores de hepatite C com achados de depósito de ferro no fígado são, com frequências da ordem de até três vezes mais, portadores do alelo C282Y e ou H63D. Além disso, observaram que a idade média para o desenvolvimento de fibrose e cirrose em pacientes com HH e VHC é relativamente menor do que entre os grupos que apresentam somente uma das patologias (Diwakaran et al., 2002; Erhardt et al., 2003; Gehrke et al., 2003). Já outros grupos que também avaliaram populações caucasóides não conseguiram estabelecer relação entre grau de fibrose hepática e mutações *HFE* (Kazemi-Shirazi et al., 1999; Negro et al., 2000; Thorburn et al., 2002).

No Brasil, da mesma forma, Martinelli et al., 2000 analisaram 135 portadores de hepatite crônica pelo VHC e encontraram frequências mais elevadas de mutações *HFE* que na população geral (4,4% de C282Y e 23,7% de H63D), respectivamente. Também observaram

associação entre sobrecarga de ferro com maiores escores de fibrose e inflamação hepática. Contudo, mais recentemente, pesquisadores do mesmo grupo, tendo estudado 375 casos, não registraram correlação entre frequência dessas mutações, sobrecarga de ferro em sangue periférico, apenas tendência a maior deposição de ferro em zona 1 e em hepatócitos (Martinelli, 2007;Souza, 2007)

Mais recentemente, vem se discutindo o papel da sobrecarga de ferro e o risco de desenvolvimento de CHC nos portadores de hepatite crônica C (Fargion *et al.*, 2001;Fujita and Takei, 2007;Mueller *et al.*, 2006;Nishina *et al.*, 2008) demonstraram em modelo experimental animal que a infecção pelo VHC exacerba a produção de radicais livres, que, por sua vez, inibem a transcrição da hepcidina. Conseqüentemente, há incremento no transporte de ferro duodenal e na liberação do ferro do interior dos macrófagos. Desta forma, elevam-se os níveis de ferro na circulação sanguínea e, finalmente, aumentam-se os depósitos de ferro em tecido hepático. Também outro trabalho demonstrou que camundongos transgênicos que expressam VHC submetidos a sobrecarga de ferro desenvolvem CHC (Furutani *et al.*, 2006). Se estes mecanismos também se aplicam em seres humanos, levando-se em conta os fatores modificadores envolvidos em cada indivíduo, contudo, é uma questão a ser esclarecida.

O estudo de coorte francês, com 301 indivíduos, conduzido por (Nahon *et al.*, 2008) comparou prospectivamente cirróticos por álcool

com aqueles por VHC. Esses autores encontraram associação da sobrecarga de ferro hepática e a mutação C282Y com CHC no grupo alcoolista, mas não nos casos de cirróticos por VHC. Apesar disso, o grupo dos infectados virais apresentou maiores níveis de sobrecarga de ferro e maior frequência de tumores hepáticos do que os alcoolistas. Também na França, Boige *et al.*, 2003, estudaram uma série de 133 indivíduos cirróticos com CHC comparados com 100 indivíduos cirróticos sem CHC, incluindo casos de portadores VHC, e não estabeleceram papel para as mutações *HFE* na carcinogênese.

Mais recentemente, o estudo de Fracanzani *et al.* (2005) demonstrou que mulheres portadoras de hepatite C H63D heterozigotas estão sujeitas a desenvolver CHC com risco seis vezes superior a outros indivíduos com hepatites virais B e C. A Tabela 1 sintetiza os principais achados de literatura a respeito destas questões.

Tabela 1.1 Hepatite Crônica pelo VHC, Sobrecarga de Ferro e Mutações no Gene *HFE*: Principais Achados das Publicações Indexadas no Banco e Dados Pubmed

Autor, Ano	N*	Principais Achados
(Di Bisceglie <i>et al.</i> , 1992)	~ 40, USA	Correlacionou sobrecarga de ferro em pacientes com VHC (36%) e sexo masculino
(Riggio <i>et al.</i> , 1997)	81, Itália	Ausência de correlação entre sobrecarga de ferro tecidual (CTF) e cirrose VHC
(Piperno <i>et al.</i> , 1998)	97, Itália	Mutações <i>HFE</i> C282Y e H63D contribuem para a sobrecarga de ferro tecidual na cirrose VHC no sexo masculino
(Smith <i>et al.</i> , 1998)	137, Inglaterra	Correlação positiva entre as mutações, sobrecarga de ferro e piora da cirrose na hepatite C, evidenciada por aumento do índice de ferro sérico e teciduais e maiores graus de fibrose
(Kazemi-Shirazi <i>et al.</i> , 1999)	184, Austria	Ausência de correlação entre gravidade da fibrose e mutações <i>HFE</i> . Possível fator de associação com sobrecarga de ferro, porém não como causa isolada
(Martinelli, A. L. <i>et al.</i> , 2000)	135, São Paulo	Correlação positiva entre as mutações <i>HFE</i> e maiores graus de fibrose, necroinflamação e ferro hepático
(Negro <i>et al.</i> , 2000)	120, França	Ausência de correlação entre elevação dos estoques de ferro e mutações <i>HFE</i>
(Bonkovsky <i>et al.</i> , 2002)	119, USA	Correlação positiva entre sobrecarga de ferro e mutações <i>HFE</i> e cirrose VHC

(Diwakaran <i>et al.</i> , 2002)	34, USA	Correlação positiva entre avanço da fibrose/cirrose, indivíduos mais jovens e presença de HH e VHC
(Thorburn <i>et al.</i> , 2002)	164, Inglaterra	Correlação negativa entre mutações <i>HFE</i> , sobrecarga de ferro e cirrose VHC. Associação com etilismo, idade, progressão da fibrose
(Gehrke <i>et al.</i> , 2003)	246, Alemanha	Correlação positiva para progressão de fibrose ou cirrose 2,5 vezes para pacientes VHC e heterozigotos <i>HFE</i> e 4,8 para heterozigotos compostos
(Erhardt <i>et al.</i> , 2003)	401, Alemanha	Associação positiva entre mutações <i>HFE</i> heterozigotas e VHC
(Rigamonti <i>et al.</i> , 2005)	121, Itália	Correlação positiva entre concentração de ferro tecidual, sexo masculino e idade menor ou igual a 50 anos e fibrose
(Fracanzani <i>et al.</i> , 2005)	222, Itália	Correlação positiva entre risco para desenvolvimento de CHC e mutação H63D heterozigota em mulheres
(Silva, I. S. <i>et al.</i> , 2005)	96, Brasil	Correlação negativa entre sobrecarga de ferro tecidual e VHC
(Bonkovsky <i>et al.</i> , 2006)	1824, USA	Correlação positiva entre mutações <i>HFE</i> , ferro hepático e resposta virológica sustentada cirrose avançado por VHC
(Valenti <i>et al.</i> , 2007)	143, Itália	Correlação entre mutações <i>HFE</i> , sobrecarga de ferro e esteatose Fatores principais infecção pelo VHC e fatores metabólicos
(Nahon <i>et al.</i> , 2008)	139, França	Ausência de correlação entre mutações <i>HFE</i> , ferro hepático e cirrose VHC

Nota*: Refere-se aos casos de VHC.

1.4 Hipótese

Siderose hepática e mutações do gene *HFE* em portadores crônicos de VHC estão associadas a maior frequência de cirrose e CHC?

1.5 Objetivos

Investigar, em portadores de hepatite crônica VHC, se existem associações de parâmetros bioquímicos de ferro elevados, presença de siderose tecidual, mutações *HFE* C282Y e H63D com fibrose hepática avançada e presença de carcinoma hepatocelular.

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

2.1. Casuística

Foram avaliados 2300 casos retrospectivamente e aplicados critérios de inclusão e exclusão.

2.1.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos os pacientes matriculados no Serviço de Hepatologia da Disciplina de Gastroenterologia Clínica ou no Serviço da Disciplina de Transplante de Fígado, com detecção de RNA do VHC por técnica de PCR e estudo anátomo-patológico de hepático. Na ausência de biópsia hepática, foram aceitos para inclusão aqueles que apresentaram dados propedêuticos comprovando cirrose hepática.

2.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos aqueles que estavam em tratamento antiviral; que apresentaram resposta virológica sustentada, sem dados clínicos, laboratoriais e anátomo-patológicos prévios disponíveis; que suspenderam as drogas antivirais em período inferior a um ano; e aqueles cuja amostra de sangue não forneceu DNA de qualidade para a genotipagem.

2.1.3 Seleção da Casuística

No levantamento retrospectivo e prospectivo do período entre janeiro de 2005 e dezembro de 2008, obteve-se lista com aproximadamente 2.300 casos com diagnóstico preliminar de hepatite crônica pelo VHC, matriculados no Serviço de Hepatologia da Disciplina de Gastroenterologia Clínica ou no

Serviço da Disciplina de Transplante de Fígado no HC-FMUSP, do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP. Foram selecionados 320 indivíduos que preencheram os critérios de inclusão e exclusão.

2.1.4 Aspectos Éticos

O presente estudo foi considerado de risco mínimo para o paciente, por envolver apenas uma punção venosa para coleta de amostra de sangue. Todo participante recebeu explicações verbais e escritas e deu seu consentimento assinado de acordo com o formulário aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP e pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq) (Anexos 6.1 e 6.2).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Coleta de Dados Clínicos, Laboratoriais e Anátomo-Patológicos

Para obtenção dos dados clínicos, laboratoriais e anátomo-patológicos, realizou-se revisão de prontuário médico manuscrito e resultados disponíveis no sistema eletrônico HCMED, da rede *intranet* do HC-FMUSP. As informações foram confirmadas ou complementadas em entrevistas com o paciente sempre que possível. Foram obtidos os seguintes parâmetros: gênero, idade, etnia, índice de massa corpórea (IMC), calculado como peso / estatura²; comorbidades crônicas; níveis séricos de ferro; saturação da transferrina; ferritina; presença de siderose e grau de fibrose hepática, presença de carcinoma hepatocelular associado.

Os dados clínicos e laboratoriais considerados foram aqueles que estavam dentro do período de 90 dias que antecederam ou sucederam a biópsia hepática.

2.2.2 Caracterização dos Parâmetros Coletados

A idade foi considerada em anos, relacionada ao momento da coleta dos dados bioquímicos séricos e de biópsia hepática. As etnias consideradas foram branca, negra, parda e asiática. A etnia foi a que o paciente declarou no registro hospitalar e confirmada pelo pesquisador quando de sua inclusão no estudo. O peso foi registrado em kg e a estatura em m. As comorbidades registradas foram as condições crônicas, os antecedentes de cirurgias de grande porte e co-infecções por vírus hepatotrópicos. Etilismo foi definido como o consumo > 40 g/ dia para o sexo masculino e > 20g/ dia para o feminino, por período mínimo de 10 anos, independente do tempo de abstinência relatado. Considerou-se sobrecarga bioquímica de ferro sempre que os valores registrados estavam em níveis acima dos limites superiores aos valores de referência estabelecidos pela rotina da Divisão de Laboratório Central HC-FMUSP.

Em relação aos dados de estudo anátomo-patológico, utilizaram-se os da rotina do Serviço de Patologia do HC-FMUSP, incluindo os de coloração hematoxilina-eosina e Perls (azul da Prússia) para todas as biópsias hepáticas. Os graus de siderose e de fibrose foram graduados de 0 a 4, segundo os critérios definidos pela Sociedade Brasileira de Hepatologia/

Sociedade Brasileira de Patologia e Metavir (Bedossa and Poynard, 1996; Gayotto, 2000).

O diagnóstico de carcinoma hepatocelular foi firmado em estudo anátomo-patológico. Quando não disponível, consideraram-se também os casos com padrão vascular típico em estudo de imagem por método dinâmico, além de nível de alfa-feto proteína ≥ 400 ng/mL (Bruix and Llovet, 2003).

Pacientes não submetidos a biópsia hepática, mas com evidências de cirrose foram considerados como grau 4 de fibrose hepática. Para isso, reconheceram-se como evidências suficientes para o diagnóstico de cirrose a existência de exame de imagem abdominal (ultra-som, tomografia computadorizada ou ressonância magnética) pela rotina do serviço que revelassem parênquima hepático de volume reduzido e ou superfície irregular, além de sinais de hipertensão portal. Os sinais clínicos compatíveis foram eritema palmar, encefalopatia hepática, ascite, ginecomastia; os laboratoriais foram hipoalbuminemia e alargamento do tempo de protrombina. Também buscou-se, para confirmação de cirrose hepática, laudos de endoscopia digestiva alta com identificação de varizes esofágicas.

2.2.3 Pesquisa das Mutações no Gene *HFE*

2.2.3.1 Infra-Estrutura

A pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Transplante de Fígado (LIM 37, Disciplina de Transplante do Fígado) e de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical (LIM 07, Disciplina de Gastroenterologia Clínica).

2.2.3.2 Extração e Análise do DNA Genômico

Coletou-se, de cada paciente, amostra de 10 mL de sangue de veia periférica em tubo com EDTA. Extraíu-se DNA genômico leucocitário pelo método modificado de (Chomczynski and Sacchi, 1987). Em um tubo de microcentrífuga, pipetaram-se 300 µl de solução de fenol e isoticianato de guanidina, Brazol[®] (LGC, Brasil) e 100 µl de sangue total. Esta suspensão foi homogenizada em vórtex por 15s, adicionaram-se 50 µl de clorofórmio (*Merck*, Alemanha). Centrifugaram-se os tubos durante 12 min a 10.000 rpm a 4 °C. Após a centrifugação, observou-se a formação de três fases: a mais inferior fenólica (proteínas), a fase intermediária (DNA) e a superior aquosa (RNA). Para precipitação do DNA transferiu-se a fase intermediária para um novo tubo de microcentrífuga contendo 300 µl de etanol 70% gelado. Homogenizou-se por 2 min em vórtex e foram centrifugados por 15 min a 10.000 rpm a 4 °C. Removeu-se o sobrenadante e acrescentou-se 300 µl de etanol absoluto gelado (*Merck*, Alemanha) ao DNA precipitado. Centrifugou-se por 15 min a 10.000 rpm a 4 °C. O DNA sedimentado no fundo do tubo foi ressuspendido com 100 µl água Milli-Q estéril.

A quantificação final de DNA foi obtida através de leitura em espectrofotômetro Nanodrop[™] ND-1000 pela absorbância em luz ultravioleta a 260 nm, e o grau de pureza do DNA foi avaliado determinada pela relação 260/A280 nm tendo sido utilizado os DNAs cuja relação foi $\geq 1,8$. As amostras de DNA foram armazenadas em geladeira 2-8°C

2.2.3.3 Pesquisa de Mutações C282Y e H63D pela Técnica de PCR em Tempo Real (RT)

A pesquisa das mutações C282Y e H63D foi realizada pela técnica de PCR em tempo real (RT) utilizando o equipamento *7300 Real Time PCR System ABI PRISM™*, (Applied Biosystem, EUA).

Foi utilizado o sistema de detecção *Taqman® SNP Genotyping Assays* (Applied Biosystems, EUA), em que os *primers* e sondas marcadas com substâncias fluorescentes, no nosso caso FAM® e VIC® pareiam na região alvo do DNA, permitindo a identificação dos diferentes alelos.

Os polimorfismos pesquisados, C282Y e H63D, já descritos em outras populações são alvos das sondas junto com seus respectivos *primers*, e estão disponíveis comercialmente no inventário do fabricante (vide Tabela 2.1).

A reação de PCR RT foi preparada utilizando-se TaqMAN® Universal PCR Master Mix (12,5 µl), 40X TaqMAN® SNP Genotyping Assay Mix* (2,5µl), DNA 10ng (2µl) e água MilliQ (8,0µl), com volume final de 25µl. Diluiu-se com tampão TE, composto por 10mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8,0 e água livre de DNA. A termociclagem ocorreu nas seguintes condições: 10 min a 95°C, 45 ciclos de 15 s a 92°C e 1 min a 60°C, em um equipamento *7300 Real Time PCR System ABI PRISM™* (Applied Biosystem, EUA).

Tabela 2.1. Descrição das Mutações *HFE* C282Y e H63D

Mutação	Substituição Posição	Localização	Seqüência <i>Primers</i> e sondas Sistema TaqMan
C282Y	G/A 845	26201120	F: CTGGGGAAGAGCAGAGATATACGT G/A R: CCAGGTGGAGCACCCAGGCCTGGAT
H63D	C/G 347	26199158	F: TGACCAGCTGTTCGTGTTCTATGAT C/G R: ATGAGAGTCGCCGTGTGGAGCCCCG

2.2.4 Análise Estatística

Para fins de análise estatística, utilizou-se o programa SPSS versão 16.0. As variáveis obtidas foram categorizadas da seguinte forma:

- Gênero: masculino (M) ou feminino (F);
- Faixa etária: 1 (18-40); 2 (41-60); 3 (61-83);
- IMC: baixo ou normal (≤ 25), elevado (> 25);
- Etilismo: ausente; presente;
- *Diabetes mellitus*: ausente; presente;
- Fibrose: leve (graus 0-2); intensa (graus 3-4);
- CHC: ausente; presente;
- Esteatose: leve (graus 0-2); intensa (graus 3-4);

-
- Siderose tecidual: ausente ou leve (0-2); intensa (3-4);
 - Ferro: Homens: normal ($\leq 158 \mu\text{g/dl}$); elevado ($> 158 \mu\text{g/dl}$);
Mulheres: normal ($\leq 145 \mu\text{g/dl}$); elevado ($> 145 \mu\text{g/dl}$);
 - Saturação de transferrina: normal (20 a 40%); elevado ($> 40\%$);
 - Ferritina:
 - Homens: normal ($\leq 400\text{ng/mL}$); elevado ($> 400 \text{ ng/mL}$);
 - Mulheres: normal ($\leq 150 \text{ ng/mL}$); elevado ($> 150 \text{ ng/mL}$);
 - Mutações *HFE*
 - C282Y: ausente, heterozigoto, homozigoto;
 - H63D: ausente, heterozigoto, homozigoto;
 - C282Y, H63D; número de alelos afetados;
 - C282Y e ou H63D: presente; ausente.

2.2.4.1 Análise Bivariada

Para análise bivariada foram utilizados os testes de Qui-quadrado e Fisher, quando apropriados. Consideraram-se fibrose e CHC como variáveis dependentes.

Os seguintes parâmetros foram utilizados como variáveis independentes: idade, gênero, *diabetes mellitus*, siderose tecidual, ferro, saturação de transferina, ferritina, mutação C282Y (ausente, heterozigota, homozigota), mutação H63D (ausente, heterozigota, homozigota), mutação C282Y (ausente ou presente), mutação H63D (ausente ou presente), frequência alélica de C282Y, H63D, ausência ou presença de C282Y e ou H63D, etnia.

2.2.4.2 Análise Multivariada por Regressão Logística Binomial

Para análise multivariada por regressão logística binomial, utilizaram-se os parâmetros que apresentaram significância estatística na análise binomial, tendo fibrose (ausente ou leve; intensa) como variável dependente.

2.2.4.3 Grupo Caso-Controle: Constituição e Análise Estatística

Adicionalmente, como mutações *HFE* ocorreram em número reduzido de indivíduos (vide resultados de mutações na seção Anexo 6.5), dificultando a interpretação das comparações prévias, complementou-se com análises num subgrupo caso-controle.

Para isso, cada paciente portador de alguma mutação *HFE* (n=91) foi pareado com um não portador similar desta mesma casuística, quanto a sexo, idade e etnia; e, sempre que possível, também para etilismo e índice de massa corpórea.

Os casos-controle que constituíram este grupo estão listados no Anexo 6.6. Procedeu-se, então, às análises bivariadas e multivariadas nesse subgrupo, de maneira idêntica à metodologia aplicada no grupo total (vide itens 2.2.4.1 e 2.2.4.2).

3. RESULTADOS

3.1 Dados Clínicos, Laboratoriais e Anátomo-Patológicos

Os dados obtidos no levantamento retrospectivo dos 320 casos estudados estão listados no Anexo 6.5. O sexo masculino representou 55,6% (n= 178) e o feminino 44,4% (n= 142). A Tabela 4 sintetiza a distribuição dos pacientes segundo: gênero, etnia branca (B), parda (P), negra (N) e amarela (A), faixas de IMC, comorbidades, médias, medianas e intervalos os parâmetros bioquímicos de ferro, saturação de transferrina e ferritina, graus de fibrose (0 a 4), presença de CHC e graus de siderose (0-4).

Obteve-se a informação de ferro sérico em 318 (99,37%) casos, de saturação de transferrina em 309 (96,6%) e, em relação à ferritina, obteve-se em 307 (95,9%). A tabela 4 apresenta as médias, medianas e intervalos desses resultados.

Dos 320 indivíduos que compuseram a casuística, não se obteve o laudo de estudo anátomo-patológico hepático em 31 casos, que tiveram atribuídos grau 4 de fibrose, pois foram considerados cirróticos segundo os achados de anamnese e propedêutica complementar. Dos pacientes com biópsia hepática, em 40 casos não se obteve informação a respeito de pesquisa de siderose hepática com a coloração de Perls.

Figura 3.1.1: No gráfico acima observa-se a distribuição dos portadores de VHC segundo gênero e etnia.

Figura 3.1.2: No gráfico acima observa-se a distribuição dos portadores de VHC segundo gênero e *diabetes mellitus*. Nota-se uma distribuição semelhante nos dois grupos.

Figura 3.1.3: O gráfico acima destaca a distribuição dos portadores de VHC segundo gênero e etilismo. Observa-se que os etilistas correspondem a 26% da casuística, com predomínio do sexo masculino.

Tabela 3.1.1 Idade, IMC e Parâmetros Bioquímicos de Ferro dos Portadores de Hepatite Crônica VHC Segundo Gênero (n=320)

CARACTERÍSTICAS		RESULTADOS			
	Gênero	Média±desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	♂	50,8±11,41	50	18	76
	♀	54,3± 11,96	56	24	83
Índice de Massa Corpórea (n)	♂	24,9 ± 4,72	25,8	13,7	41,0
	♀	27, 0 ± 4,8	26,2	17,2	42,2
Ferro sérico (µg/dl)	♂	161±72,3	158	25	300
	♀	136±64,4	124	20	311
Saturação da Transferrina (%)	♂	57± 0,24	55	6	100
	♀	46 ±23,9	39	7	100
Ferritina (ng/mL)	♂	719±794,5	522	6	6379
	♀	485±1103,5	181	5	9170

Nota: resultados expressos média, mediana, desvio padrão, valores mínimos–máximos, segundo gênero.

O nível de ferro estava aumentado em 58,8% dos casos, a saturação de transferrina em 60,1%, ferritina em 56,6% e a siderose tecidual estava aumentada em 20% dos casos estudados. Os gráficos abaixo demonstram a distribuição dos perfis bioquímicos do ferro em relação aos graus de fibrose.

Figura 3.1.4 O gráfico ao lado destaca a distribuição dos níveis séricos de ferro em portadores de VHC segundo graus de fibrose (n=318). Os pacientes com fibrose leve (1-2) apresentaram valores máximos e mínimos em limites próximos aos daqueles com fibrose avançada. Entretanto, os pacientes com fibrose avançada apresentaram medianas mais elevadas. Apenas os casos sem fibrose apresentaram níveis próximos dos limites de referência.

Figura 3.1.5 O gráfico acima destaca dos níveis bioquímicos de saturação de transferrina em portadores de VHC segundo graus de fibrose.

Figura 3.1.6: O gráfico acima destaca a distribuição dos níveis séricos de ferritina em portadores de VHC segundo graus de fibrose. Notam-se níveis de ferritina com variações amplas nos pacientes independentemente do grau de fibrose. A exceção foi para os casos sem fibrose que apresentaram valores próximos aos valores de referência.

Figura 3.1.7 O gráfico destaca a distribuição dos níveis bioquímicos de saturação de transferrina em portadores de VHC segundo a frequência alélica da mutação C282Y. Nos pacientes com a presença de dois alelos mutantes as medianas foram mais elevadas.

Figura 3.8 e 3.9: Os gráficos destacam a variação dos níveis séricos de ferritina em portadores de VHC segundo o número de alelos da mutação C282Y e H63D respectivamente.

Figura 3.1.10: O gráfico destaca a distribuição dos níveis séricos de saturação de transferrina em portadores de VHC segundo o número de alelos da mutação H63D. Nota-se que a saturação de transferrina variou de forma crescentes com a freqüência de alelos mutados para H63D.

Figura 3.1.11: O gráfico acima destaca a distribuição dos graus de fibrose em portadores de VHC (n=320), em relação ao gênero.

Figura 3.1.12: No gráfico acima observa-se a distribuição dos graus de siderose em portadores de VHC, em relação ao gênero.

Figura 3.1.13: O gráfico acima destaca a distribuição dos portadores de VHC segundo gênero e carcinoma hepatocelular. $p = 0.221$ (* Teste de Fisher).

3.2 Genotipagem *HFE* para Mutações C282Y e H63D por método de PCR em Tempo Real

A mutação C282Y ocorreu na frequência alélica de 12/284 (4,2%) em mulheres e 10/356 (2,8%) homens e H63D em 39/284 (13,7%) em mulheres e 52/356 (14,6%) homens. Note-se que cada indivíduo possui dois alelos. Os resultados estão listados no Anexo 6.6. As Figuras 3.2.1 e 3.2.2 ilustram os padrões de gráficos obtidos nas pesquisas das mutações pelo método de PCR em tempo real.

Figura 3.2.1 Gráfico gerado na pesquisa de polimorfismos C282Y pela técnica de PCR em tempo real (ABI 3700™).

Figura 3.2.2 Gráfico gerado na pesquisa de polimorfismos H63D pela técnica de PCR em tempo real (ABI 3700™).

3.3 Resultados da Análise Estatística

3.3.1 Resultados das Análises Bivariadas

Inicialmente, procedeu-se à análise bivariada do grupo de estudo tendo fibrose como variável dependente.

As comparações realizadas estão demonstradas nas tabelas abaixo.

TABELA 3.3.1.1 Parâmetros Epidemiológicos e Clínicos Correlacionados com a Evolução da Fibrose Hepática em Portadores de Hepatite Crônica VHC (n=320): Análise Bivariada

VARIÁVEL	<i>p</i>
Gênero	0,009*
Idade	0,000**
IMC	0,399*
Etilismo	0,013*
<i>Diabetes mellitus</i>	0,219*
Esteatose Hepática Tecidual	0,183*

Nota: Significância estatística $p \leq 0,05$ *Teste de Fisher **Teste de Qui-quadrado

Quando se analisaram os parâmetros epidemiológicos e clínicos houve correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre fibrose intensa e as variáveis: sexo masculino, idade mais avançada e antecedente de etilismo. Contudo não se encontrou correlação entre fibrose intensa e índice de massa corpórea aumentado, presença diabetes mellitus e esteatose.

TABELA 3.3.1.2 Siderose Bioquímica e Tecidual Correlacionados com a Evolução da Fibrose Hepática em Portadores de Hepatite Crônica VHC: Análise Bivariada

VARIÁVEL	<i>p</i>
Ferro	0,019*
Saturação de Transferrina	0,001*
Ferritina	0,040*
Siderose Tecidual	0,126*

Nota: Significância estatística $p \leq 0,05$ *Teste de Fisher

Comparando-se siderose bioquímica e tecidual, observou-se correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre fibrose intensa e níveis bioquímicos aumentados de ferro, saturação de transferrina e ferritina. Entretanto, não se estabeleceu similar associação para a variável siderose tecidual.

TABELA 3.3.1.3 Mutações *HFE* Correlacionados com a Evolução da Fibrose Hepática em Portadores de Hepatite Crônica VHC (n=320): Análise Bivariada

Variável e Categorias		Fibrose Leve	Fibrose Intensa	<i>p</i>
Mutação C282Y	Ausente	147	154	0,110*
	Presente	6	13	
Mutação C282Y	Ausente	147	154	0,143**
	Heterozigoto	4	12	
	Homozigoto	2	1	
Mutação H63D	Ausente	121	116	0,033*
	Presente	32	51	
Mutação H63D	Ausente	121	116	0,081**
	Heterozigoto	27	47	
	Homozigoto	5	4	
Mutação C282Y, H63D	Ausente	116	107	0,015*
	Presente	37	60	
Mutação C282Y e ou H63D	Ausente	116	107	0,053**
	1 alelo mutante	29	51	
	2 alelos mutantes	8	9	

Nota: *Teste de Fisher **Teste Qui-quadrado

Não houve correlação estatisticamente significativa entre fibrose intensa e alelo C282Y, nem para a pesquisa da presença ou ausência da mutação, tampouco se diferenciando os portadores da forma heterozigota com as homozigotas o mesmo ocorreu para o alelo H63D. Já a presença

do alelo H63D ocorreu em associação estatisticamente significativa com maiores graus de fibrose.

A correlação mais intensa ($p=0,015$) foi observada quando se pesquisou a associação entre graus de fibrose mais elevados e a presença de mutações *HFE* (C282Y ou H63D). A presença de um alelo mutante (seja C282Y ou H63D) demonstrou valor próximo do nível de significância para fibrose mais intensa.

TABELA 3.3.1.4 Siderose Bioquímica e Tecidual Correlacionados com CHC em Portadores de Hepatite Crônica VHC: Análise Bivariada

VARIÁVEL	<i>p</i>
Ferro	0,472*
Saturação de Transferrina	0,068*
Ferritina	0,477*
Siderose Tecidual	0,381*

Nota: Significância estatística $p \leq 0,05$ *Teste de Fisher

Quando se comparou a relação entre níveis aumentados de parâmetros bioquímicos e teciduais de ferro com a presença de CHC não se observou correlação estatisticamente significativa. Entretanto, apenas a variável saturação de transferrina elevada apresentou valor de $p=0,068$, próximo nível de significância.

TABELA 3.3.1.5 Mutações *HFE* Correlacionadas com CHC em Portadores de Hepatite Crônica C (N=320): Análise Bivariada

Variável e categorias		Ausente	Presente	<i>p</i>
C282Y	Ausente	259	42	0,126**
	Heterozigoto	11	5	
	Homozigoto	3	-	
C282Y	Ausente	259	42	0,129*
	Presente	14	5	
H63D	Ausente	205	32	0,493**
	Heterozigoto	60	14	
	Homozigoto	8	1	
H63D	Ausente	205	32	0,201*
	Presente	68	15	
Mutação C282Y e ou H63D	Ausente	195	28	0,159**
	1 alelo mutante	63	2	
	2 alelos mutantes	15	17	
Mutação C282Y, H63D	Ausente	195	28	0,074*
	Presente	78	19	

Nota: * Teste de Fisher **Teste de Qui-quadrado

Não se atingiu significância estatística nas comparações entre mutações *HFE* e presença de CHC. Apenas quando se analisou portadores de qualquer uma das mutações *HFE*, seja na forma hetero ou homozigota em um único grupo é que se atingiu $p= 0,074$, próximo do nível de significância.

3.3.2 Análise Multivariada por Regressão Logística

Tabela 3.3.2.1 Variáveis Associadas a Evolução da Fibrose em Portadores de Hepatite Crônica VHC (N=320): Análise Multivariada por Regressão Logística

Variáveis	Coeficiente	Odds ratio (IC* 95%)	p
Idade	0,860	2,362 (1,492-3,741)	0,000
Etilismo	0,780	2,181 (1,237-3,847)	0,007
Saturação de Transferrina	0,740	2,109 (1,195-3,723)	0,010
Presença de Mutação H63D	0,678	1,969 (1,066-3,635)	0,030

Nota: IC* intervalo de confiança. Foram excluídas as variáveis: gênero, ferro, ferritina, mutações C282Y, H63D ($p > 0,05$).

Com objetivo de demonstrar-se quais as variáveis estariam independentemente associadas à progressão da fibrose foram selecionadas as variáveis que apresentaram $p < 0,5$ na análise bivariada. Na tabela acima observam-se que as variáveis idade avançada, antecedentes de etilismo, saturação de transferrina elevada e presença da mutação H63D apresentaram um risco aproximadamente 2 vezes maior para a progressão da fibrose que os pacientes que não apresentam estas condições.

3.3.3 Resultados da Análise Bivariada do Grupo Caso-Controlle

Tabela 3.3.3.1 Parâmetros Epidemiológico e Clínico Correlacionados com a Evolução de Fibrose Hepática em Portadores de Hepatite Crônica VHC no Grupo Caso-Controlle (n=182): Análise Bivariada

VARIÁVEL	P
Gênero	0,211**
Idade	0,005*
IMC	0,949*
Etilismo	0,007**
<i>Diabetes mellitus</i>	0,528**
Etnia	0,031**

Nota: *Teste de Qui-quadrado. **Teste de Fisher

Quando se comparou no grupo caso-controle fibrose mais intensa e parâmetros epidemiológicos e clínicos não se observaram significância estatística para gênero, IMC e *diabetes mellitus*. Entretanto, os parâmetros idade mais avançada, etilismo e indivíduos da etnia branca demonstraram correlação estatística significativa para fibrose mais intensa.

Tabela 3.3.3.2 Níveis de Siderose Bioquímica e Tecidual Correlacionados com a Evolução de Fibrose Hepática em Portadores de Hepatite Crônica VHC no Grupo Caso-controle: Análise Bivariada

VARIÁVEL	P
Ferro	0,043*
Saturação de Transferrina	0,001*
Ferritina	0,012*
Siderose	0,203*

Nota: *Teste de Fisher

Quando se comparou a relação níveis de siderose bioquímica aumentados em relação à presença fibrose mais intensa encontrou-se correlação estatisticamente significativa $p < 0,05$. Entretanto esta correlação não foi observada na siderose tecidual.

TABELA 3.3.3.3 Presença de Mutações *HFE* Correlacionados com a Evolução da Fibrose Hepática em Portadores de Hepatite Crônica VHC no Grupo Caso-Controle: Análise Bivariada

FIBROSE		Leve	Intensa	<i>P</i>
C282Y	Ausente	85	78	0,099**
	Heterozigoto	4	12	
	Homozigoto	2	1	
C282Y	Ausente	85	78	0,072*
	Presente	6	13	
H63D	Ausente	61	44	0,022**
	Heterozigoto	25	43	
	Homozigoto	5	4	
H63D	Ausente	61	44	0,008*
	Presente	30	47	
Mutação C282Y e ou H63D	Ausente	56	35	0,006**
	1 alelo mutante	27	47	
	2 alelos mutantes	8	9	
Mutação C282Y, H63D	Ausente	56	35	0,001*
	Presente	35	56	

Nota: *Teste de Fisher, **Teste de Qui-quadrado

Quando se analisaram as relações entre mutações no gene *HFE* e graus de fibrose, observou-se significância estatística para a presença da mutação H63D e fibrose intensa. O mesmo observou-se para a frequência alélica da mutação *HFE*, seja C282Y e ou H63D.

A correlação mais intensa ($p=0,001$) foi observada quando se pesquisou a associação entre graus de fibrose mais elevados e a presença de mutações *HFE* (C282Y ou H63D), enquanto que os portadores de C282Y não apresentaram correlação estatisticamente significativa para fibrose mais intensa.

TABELA 3.3.3.4 Presença de Mutações *HFE* Correlacionadas com CHC em Portadores de Hepatite Crônica VHC no Grupo Caso-Control: Análise Bivariada

Variável e Categorias		CHC Ausente	CHC Presente	P
Mutação C282Y	Ausente	143	20	0,086**
	Heterozigoto	11	5	
	Homozigoto	3	0	
Mutação C282Y	Ausente	143	20	0,097*
	Presente	14	5	
Mutação H63D	Ausente	94	11	0,265**
	Heterozigoto	55	13	
	Homozigoto	8	1	
Mutação H63D	Ausente	94	11	0,102*
	Presente	63	14	
Mutação C282Y, H63D	Ausente	84	7	0,015*
	Presente	73	18	

3.3.4 Análise Multivariada por Regressão Logística do Grupo Caso-Controle

Tabela 3.3.4.1 Variáveis Correlacionadas com Evolução de Fibrose Hepática e CHC em Portadores de Hepatite Crônica VHC no Grupo Caso-Controle: Análise Multivariada

Variáveis	Coefficiente	Odds Ratio	p
Fibrose			
Saturação de Transferrina	0,991	2,694 (1,227-5,916)	0,014
Mutação H63D	3,518	33,703(4,252-267,150)	0,001
Mutação C282Y	3,449	31,446 (2,694-367,547)	0,006
CHC			
Saturação de Transferrina	1,864	6,451 (1,758-23,665)	0,003
Ferro	-1,451	0,234 (0,075-0,729)	0,011
Presença de Mutação	1,0192	0,770 (0,955-8,03)	0,051

Nota: Foram excluídas as variáveis: etilismo, ferro, ferritina ($p > 0,05$). Variáveis com IC $< 1,0$: idade, presença das mutações C282Y, H63D e etnia.

Com objetivo de se demonstrar, no grupo caso-controle, quais variáveis estariam independentemente associadas à progressão da fibrose, selecionaram-se aquelas que apresentaram $p < 0,05$ na análise bivariada. Na tabela acima, observa-se que saturação de transferrina elevada e presença de mutação H63D e ou C282Y estão correlacionadas com progressão da fibrose. Nesta análise, presença de mutação *HFE* (C282Y e ou H63D), como fator independente, teria impacto significativo para progressão de fibrose (OR > 30), enquanto saturação de transferrina elevada revelou OR de 2,69 apenas.

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho reflete a experiência de um centro de referência para hepatite crônica C no Estado de São Paulo. Nesta casuística (n=320), casos com fibrose avançada representaram 51,9% e portadores de CHC, 15%. Essas características podem ser explicadas, pelo menos parcialmente, pelo ambiente do hospital-escola, voltado para as patologias de alta complexidade, incluindo serviço de transplante hepático.

O próprio desenho do estudo permitiu a inclusão de casos mais graves ao admitir indivíduos não submetidos a biópsia hepática, seja porque não houvesse condições clínicas e laboratoriais, seja porque a gravidade dos achados clínicos, dos exames laboratoriais e de imagem já houvessem estabelecido o diagnóstico de cirrose hepática.

O fato de ter se partido do cadastro dos portadores crônicos VHC matriculados nos ambulatórios de Hepatologia e de Transplante Hepático e realizado o levantamento retrospectivamente também confere peculiaridades que diferem daqueles estudos que analisam os casos a partir das biópsias hepáticas ou daqueles prospectivos. Em vários casos, não foi possível obter todos os dados clínicos e laboratoriais à época da admissão, por não haver registro completo das informações. Indivíduos em estágio de cirrose hepática sem biópsia também não foram analisados em relação à sobrecarga de ferro tecidual. O Anexo 6.5 listou cada um desses casos.

Se, por um lado não se determinou o índice de ferro tecidual, por outro, destaca-se o fato de que a rotina do Serviço de Anatomia Patológica do HC-FMUSP prima por realizar a semi-quantificação pela coloração de Perls em todas as amostras de fígado. Como existe correlação significativa entre o índice de ferro hepático e a análise semi-quantitativa por coloração de Perls em portadores de VHC (Silva, L. K. *et al.*, 2005), considerou-se este último método suficiente para o presente estudo.

Nesta casuística, observou-se forte correlação entre sexo masculino, idade mais avançada e antecedente de etilismo com fibrose intensa. De fato, essas associações já estão bem definidas na literatura (Arber *et al.*, 1994; Massard *et al.*, 2006; McCaughan and George, 2004; Poynard *et al.*, 2001). Contudo, não se confirmaram correlações de fibrose intensa com IMC elevado, antecedentes de *diabetes mellitus* e presença de esteatose hepática. A falta de correlação entre fibrose intensa e esteatose poderia ser atribuída ao fato de se tratar de uma população em que o genótipo 3 representa apenas 30,2% dos casos (Campiotto *et al.*, 2005; Notaroberto, 2004)

Os parâmetros bioquímicos relacionados ao ferro, bem como as frequências de achados de siderose hepática da atual casuística situam-se entre os maiores valores da literatura. Di Bisceglie *et al.* (1992) estudando 80 portadores de hepatite crônica (cerca de 50% dos quais por VHC), relataram elevações de ferro em 36% dos pacientes e ferritina em até 42% dos indivíduos; enquanto isso, a série atual exibiu

valores de 58,8% e 56,6%, respectivamente. As demais publicações, incluindo dois estudos brasileiros, apresentam sempre percentagens menos expressivas (Tabela 1), conforme mencionado na Seção Introdução (todas as referências da Tabela 1). (Bonkovsky *et al.*, 2006; Bonkovsky *et al.*, 2002; Di Bisceglie *et al.*, 1992; Diwakaran *et al.*, 2002; Erhardt *et al.*, 2003; Fracanzani *et al.*, 2005; Gehrke *et al.*, 2003; Kazemi-Shirazi *et al.*, 1999; Martinelli, A. L. *et al.*, 2000; Nahon *et al.*, 2008; Negro *et al.*, 2000; Rigamonti *et al.*, 2005; Riggio *et al.*, 1997; Silva, I. S. *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1998; Thorburn *et al.*, 2002; Valenti *et al.*, 2007)

Ao analisar a correlação de fibrose intensa com os três parâmetros bioquímicos de sobrecarga de ferro, permanece a questão de qual evento teria se instalado inicialmente: a sobrecarga de ferro promovendo lesão hepática, ou, ao contrário, a fibrose avançada promovendo elevação dos perfis de ferro investigados.

Inúmeras são as evidências de que o ferro é fator agressor para os hepatócitos; mais ainda, que o ferro pode modular a infecção pelo VHC. O ferro interage diretamente com os mediadores das células imunológicas, enfraquecendo os mecanismos mediados por Th1, como a produção de TNF α e a formação de óxido nítrico (Recalcati *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 1994). Com isso, induz-se a expressão das citocinas anti-inflamatórias Th2, favorecendo doenças infecciosas, incluindo o VHC (Weiss *et al.*, 1999). Além disso, o ferro promove geração de radicais livres e estresse oxidativo (Bonkovsky *et al.*, 2002; Pietrangelo,

2002;2003). Por fim, como o ferro é essencial na nutrição de todas as células, os estoques de ferro excedente poderiam favorecer a replicação viral (Kakizaki *et al.*, 2000).

Os estudos clínicos corroboram tais idéias. A depleção de ferro em portadores VHC é seguida de melhora de parâmetros ligados à atividade necroinflamatória hepática, mas não de melhores taxas de resposta virológica sustentada. Permanece, portanto, a idéia de que a agressão inflamatória relacionada ao ferro não estaria ligada à replicação viral, mas sim à presença do metal excedente diretamente (Fargion *et al.*, 2002; Fontana *et al.*, 2000; Sherrington and Olynyk, 2002; Van Thiel *et al.*, 1996). Além disso, cada vez mais tem se evidenciado que elevações das aminotransferases, dos marcadores séricos de fibrogênese e deposição de ferro no CHC estão associados com o aumento da atividade histológica, fibrose mais avançada, presença de cirrose e desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Sherrington and Olynyk, 2002). No entanto, o presente estudo não demonstrou correlação de fibrose intensa ou presença de CHC com graus mais elevados de siderose tecidual.

Uma outra possibilidade para explicar a associação de fibrose avançada com elevação dos parâmetros bioquímicos de ferro, seria, então, que os indivíduos cirróticos cursassem com maior liberação de ferro livre para a circulação em decorrência da hipertensão portal, esplenomegalia, hemocaterese acentuada e formação de *shunts* arterio-venosos com hemólise. A saturação da transferrina elevada

ainda pode ser atribuída à redução da produção de proteínas do cirrótico (assim como ocorre hipoalbuminemia), com a hipotransferrinemia favorecendo acentuação desse parâmetro. Além disso, quando se analisam as comorbidades, identificam-se etiologias como insuficiência renal crônica, anemia hemolítica, porfiria cutânea tardia, antecedentes pessoais de etilismo e politransfusões que, caso a caso, justificam a sobrecarga de ferro independentemente da infecção crônica pelo VHC. Portanto, neste conceito, a sobrecarga bioquímica de ferro é um marcador de gravidade da doença hepática (Guyader *et al.*, 2007).

Por fim, a hiperferritinemia, que é o mais frequente achado dos parâmetros de sobrecarga de ferro investigados, poderia ser atribuída à própria infecção pelo VHC, que estimula as vias inflamatórias e, paradoxalmente, inibe a síntese de hepcidina, promovendo elevação dos níveis de ferro plasmático (Fujita *et al.*, 2007; Nahon *et al.*, 2008).

O presente estudo reafirmou que mutações *HFE* acentuam a fibrose e o risco para CHC na hepatite crônica C. Na análise bivariada envolvendo toda a casuística (n=320), a ocorrência de pelo menos um alelo H63D no indivíduo (mas não do alelo C282Y) foi observado em associação com fibrose intensa. Visto que a mutação C282Y ocorreu em apenas 13 (4,1%) indivíduos, procedeu-se à análise do subgrupo caso-controle. De fato, quando se comparou indivíduos com e sem mutações *HFE*, filtrando-se as principais condições que poderiam interferir na progressão da fibrose, não

somente a H63D, mas ambas se revelaram em associação com graus de fibrose avançados. A análise multivariada confirmou importância de ambos os alelos, C282Y (OR=31,45; p=0,006) e H63D (OR=33,70; p=0,001). Esses dados estão de acordo com o descrito por Piperno *et al.* (1997), que descreveu que cirróticos VHC do sexo masculino, com C282Y e ou H63D, apresentam maiores níveis de sobrecarga de ferro, destacando o papel de ambas as mutações. O estudo de Gehrke *et al.* (2003), com metodologia não comparável com o atual estudo, encontrou risco para progressão de fibrose ou cirrose em pacientes VHC 2,5 vezes maior em heterozigotos C282Y e 4,8 para heterozigotos compostos. Outros autores também relataram a importância da C282Y na progressão da fibrose na hepatite C (Ladero *et al.*, 2003; Nelson, J. E. *et al.*, 2007).

Curiosamente, a mutação C282Y é que está claramente associada à HH; a H63D é classicamente associada a distúrbio do ferro mais brando e somente quando em associação com a C282Y. Cabe, então, questionar se as mutações *HFE* contribuiriam para evolução desfavorável da fibrose hepática por via outra que não a da promoção de sobrecarga de ferro.

Outro aspecto notório foi que os portadores VHC da atual casuística de portadores VHC apresentaram frequências alélicas de C282Y de 4,2% em mulheres e 2,8% homens, sendo que, em brasileiros brancos, essa cifra atinge apenas 1,4% (Agostinho *et*

al.,1999; Pereira *et al.*, 2001). A questão que se segue é a possibilidade de haver relação entre mutação C282Y e susceptibilidade a infecção pelo VHC.

Quando se pesquisou na casuística total a correlação entre mutações *HFE* e ocorrência de CHC no grupo geral, o resultado foi negativo. Interessantemente, na análise restrita ao grupo caso-controle, a presença das mutações C282Y e ou H63D correlacionou-se positivamente com a presença de CHC. Este achado impacta contra recentes publicações (Valenti *et al.*; 2007; (Nahon *et al.*, 2008)), que não identificaram tais associações, e mesmo com os estudos de Fracanzani *et al* (2005) e (Roperio *et al.*, 2007), que identificaram correlação apenas com H63D. O estudo de (Mah *et al.*, 2005) também evidenciou associação apenas para a H63D com cirrose em portadores VHC, mas nesse, caso, compreende-se a ausência de C282Y por se tratar de um estudo asiático em Taiwan, que não apresenta essa variante alélica na população geral local (Adams *et al.*, 2005).

Na busca de melhores explicações para os achados do atual estudo, uma pista interessante está nos primórdios da descoberta do gene *HFE*, identificado em íntima associação com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I, tendo C282Y em desequilíbrio de ligação com HLA A3, e H63D com HLA A29 (Cardoso and de Sousa, 2003). Nessa linha de pensamento, poder-

se-ia supor que, não as mutações *HFE* por si, mas todo o contexto dos alelos em desequilíbrio de ligação caracterizasse padrões imunogenéticos favorecedores da infecção pelo VHC, ou de evolução para fibrose acentuada e, talvez, ainda, para transformação carcinomatosa. Ainda são poucos os estudos que correlacionam aspectos imunogenéticos com a progressão da hepatite crônica C, pois são dispendiosos e bastante dificultados pela variabilidade étnica e geográfica dos genes HLA (Wang *et al.*, 2009).

Portanto, os resultados atuais confrontam a tendência atual de não se creditar valor a mutações *HFE* como fator de risco na evolução da hepatopatia pelo VHC (Drakesmith and Prentice, 2008). A proposta que se segue é aplicar, no acompanhamento do portador crônico VHC, a genotipagem *HFE*. Os que se revelassem portadores de mutações C282Y e ou H63D deveriam ser rigorosamente supervisionados quanto à evolução da fibrose hepática e a complicações ligadas a cirrose, bem como submetidos a rastreamento atento para detecção precoce de CHC.

Ainda há muito para se conhecer a respeito do mecanismo de infecção pelo VHC e suas consequências sobre o fígado e o metabolismo sistêmico. A entrada do VHC no hospedeiro humano promove inflamação, estresse oxidativo em retículo endoplasmático, gera radicais livres, induz a resposta imune inata, altera proteínas da superfície do hepatócito, promove formação de esteatose hepática e

resistência à insulina (ISOM *et al.*, 2009). É bastante verossímil que, nesta complexa trama, a interação entre VHC e metabolismo do ferro - seja como causa, seja como consequência dos distúrbios observados - esteja sujeita à influência de polimorfismos do gene *HFE* ou de seus alelos em desequilíbrio de ligação.

5. CONCLUSÕES

Houve correlação de graus mais avançados de fibrose com níveis elevados de ferro, saturação da transferrina e ferritina; contudo, esses marcadores também podem estar igualmente elevados nos indivíduos com pouca fibrose. Em diversos casos, a sobrecarga bioquímica de ferro foi provavelmente apenas consequência da doença hepática avançada.

As mutações *HFE* ocorreram em associação com maiores graus de alteração arquitetural; além disso, os portadores de H63D e C282Y apresentaram CHC com maior frequência que seus casos-controle. Como não houve associação entre siderose tecidual e fibrose, é possível que a agressão hepática das mutações *HFE* ocorra por via indireta, que não a da sobrecarga de ferro.

6. ANEXOS

6.1 Aprovação do Protocolo de Pesquisa na Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do HC-FMUSP

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27.10.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 833/04, intitulado: "Estudo do papel das mutações do gene *HFE* na sobrecarga de ferro em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C" apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Marcel Cerqueira César Machado

Pesquisador(a) Executante: Dra. Ana Lúcia Bernardes

CAPPesq, 27 de Outubro de 2004.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

6.2 Aprovação do Protocolo de Pesquisa na Comissão de Ética do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP

FACULDADE DE MEDICINA
da Universidade de São Paulo

Declaração

Declaro que estou de acordo com o projeto de pesquisa intitulado "Estudo do Papel das Mutações do Gene *HFE* na Sobrecarga de Ferro em Pacientes Infectados pelo Vírus da Hepatite C", sob responsabilidade do Prof. Dr. Marcel Cerqueira César Machado, da pesquisadora executante Ana Lúcia Bernardes e sob orientação do Dr^a. Marta Mitiko Deguti, aprovado pela CAPpesq (nº. 833/04) em 27/10/2004, para avaliação e aprovação da Comissão de pesquisa para a participação dos pacientes do Departamento de Gastroenterologia Clínica.

São Paulo, 12 de maio de 2006.

Prof. Dr. Flair José Carrilho
Chefe do Departamento de Gastroenterologia Clínica
FMUSP

6.3 Termo de Consentimento Ético e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FMUSP DISCIPLINA DE TRANSPLANTE E CIRURGIA DO FÍGADO DISCIPLINA DE GASTROENTEROLOGIA CLÍNICA

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

1. Existe uma doença chamada Hemocromatose, cujo diagnóstico pode ser feito através de uma amostra de sangue. Essa doença pode causar acúmulo de ferro no fígado.
 2. Essa doença quando associada ao vírus da hepatite ou ao excesso de bebida alcoólica, pode piorar a doença do fígado.
 3. Quando se descobre esta doença em fases iniciais pode ser feito um tratamento, que retira o excesso de ferro depositado no fígado.
 4. Para participar desta pesquisa é necessário colher 10ml de sangue para extração de DNA (quantidade pequena que não prejudica o organismo) de uma só vez; o único inconveniente é a picada da agulha.
 5. As informações referentes à biópsia hepática (quando a mesma tiver sido realizada) serão utilizadas no estudo.
 6. O Sr.(a) é livre para decidir se quer ou não participar da pesquisa.
 7. Caso não queira participar, nós garantimos que seu tratamento neste Hospital será o mesmo.
 8. Caso deseje participar, nós guardaremos segredo de sua identidade.
- Observação: este material poderá permanecer guardado para futuras pesquisas, seguindo sempre os preceitos de ética reconhecidos nesta instituição e internacionalmente.

Recebi as informações acima e concordo em participar.

São Paulo, ____ de _____ de _____.

Nome legível, RG e assinatura do paciente.

Telefone: _____

Endereço: _____

Pesquisadores responsáveis: Dra. Marta Mitiko Deguti (Tel. 3061-7270);
Bióloga Ana Lúcia Bernardes (Tel: 3061-7270) Laboratório de Transplante
e Cirurgia do Fígado(LIM37) FMUSP Avenida Dr. Arnaldo, 455 3º andar –
Pacaembu.

Anexo 6.4.1 Lista de Casos, Características Demográficas e Clínicas

CASO	GÊNERO	IDADE	COR	IMC	COMORBIDADES	ETILISMO
1	F	60	B	22,2		N
2	F	62	B	*	HAS, IRC, hepatite medicamentosa	N
3	F	47	M	*	Lupus eritematoso discoide	S
4	M	63	B	21,9		S
5	M	48	N	22,2		S
6	M	34	B	25,8	Neuropatia, AntiHBc reagente	N
7	M	68	B	38,2		S
8	M	46	M	31,8		N
9	M	55	B	24,0	Nefrectomia, IRC	N
10	M	46	B	27,5		*
11	F	31	B	31,2		N
12	M	28	B	*		N
13	M	38	B	28,4		S
14	F	61	B	25,1		N
15	F	62	M	28,7		N
16	M	60	B	27,9		*
17	M	67	B	23,7	Adenocarcinoma de reto	N
18	F	52	B	33,6	Transplante hepático	S
19	F	61	B	*		S
20	M	43	B	22,6	Doença Celiaca, asma	N
21	M	50	B	17,8	Transplante hepático	S
22	M	62	B	*		*
23	M	47	B	*	HAS	N
24	M	47	B	24,9	Hipertrigliceridemia	N
25	M	68	B	27,5		N
26	M	68	B	26,6	HAS	*

Anexo 6.4.1 Lista de Casos, Características Demográficas e Clínicas

27	M	57	B	25,6		S
28	M	53	B	*	Esquistossomose HE	N
29	M	31	A	24,4	Cirurgia cardíaca	N
30	F	37	B	*	Epilepsia, hipotireodismo, hemangioma	*
31	F	58	M	23,3		N
32	F	59	B	30,7		N
33	F	64	B	33,3	Fibromialgia, hipotireodismo	N
34	F	53	B	25,0		N
35	F	50	M	18,8		N
36	M	57	B	31,1	HAS	N
37	M	39	M	31,9		N
38	M	43	N	27,1		S
39	M	45	B	24,5		S
40	M	22	B	26,1	Hepatite crônica VHB	S
41	M	41	M	29,8	Dislipidemia	N
42	F	55	B	24,6	Hipotireodismo	N
43	F	32	M	*		*
44	M	47	B	22,2	Hepatite crônica VHB	*
45	M	41	B	23,0		N
46	F	54	M	30,5	Liquen plano, HAS	N
47	M	57	B	29,1	Hepatite crônica VHB	*
48	M	59	B	*		S
49	M	62	N	26,4	HAS	S
50	F	44	M	24,4		N
51	M	58	B	*		*
52	M	47	B	27,7	Dislipidemia	N
53	F	64	B	31,9		N

Anexo 6.4.1 Lista de Casos, Características Demográficas e Clínicas

54	M	47	B	29,8	Protese cardíaca	S
55	F	56	M	24,8		N
56	M	53	B	29,8		*
57	F	52	B	24,7		S
58	F	35	B	23,7		N
59	M	56	M	25,2		S
60	M	41	B	25,9		S
61	M	73	B	25,9	HAS	N
62	M	43	M	22,9	Transplante renal, hipotireoidismo	N
63	F	58	A	20,9	Tumor duodeno, hipotireoidismo, HAS	N
64	M	58	B	21,6		S
65	M	31	B	24,9		S
66	M	49	N	23,6	Nefrolitíase, IRC	S
67	M	48	B	32,2		S
68	F	39	M	27,4		N
69	F	61	B	25,4	Psoríase	N
70	M	50	B	34,9	Porfiria cutânea tardia	*
71	M	65	B	22,9	Prostatectomia, transplante de fígado	N
72	F	56	B	20,4		S
73	M	36	B	24,2	Esferocitose	N
74	F	58	B	23,2	Doença policística renal	N
75	F	47	B	*		*
76	M	44	B	26,8		S
77	M	19	B	21,0		*
78	F	51	B	23,7		N
79	F	58	M	29,4		N
80	F	49	B	20,2	IRC	N

Anexo 6.4.1 Lista de Casos, Características Demográficas e Clínicas

81	M	50	B	24,2		N
82	M	51	B	22,2	Transplante hepático	S
83	M	18	B	17,0	Anemia falciforme	*
84	M	43	B	22,1	Pancreatite crônica	S
85	M	33	B	23,6		N
86	M	48	M	25,5		N
87	M	49	B	29,4	HAS	S
88	F	58	B	28,1	HAS	N
89	F	61	B	29,2	Esquistossomose HE	S
90	M	60	M	19,4		S
91	M	46	N	23,1	Esquistossomose HE	S
92	M	60	B	*		*
93	M	62	B	*	HAS, paraplegia por FAF	N
94	M	46	B	24,6		S
95	F	62	B	*	Transplante hepático	*
96	M	45	M	28,5		S
97	M	50	B	33,8		N
98	M	62	B	*	Hepatite crônica VHB	*
99	M	66	M	23,6		N
100	M	59	B	21,5	Osteoporose, pancreatite crônica, Tb	S
101	M	51	B	28,4	Malária, hanseníase, transplante hepático	N
102	M	55	B	24,2	Transplante de córnea	S
103	F	25	B	22,3		N
104	M	48	B	35,7		N
105	F	61	B	*		S
106	F	55	B	32,9	IRC, HAS, Colecistopatia crônica	S
107	M	74	B	13,7		N

Anexo 6.4.1 Lista de Casos, Características Demográficas e Clínicas

108	M	55	B	21,4	HAS, tuberculose, gota	N
109	F	35	B	32,4	Dislipidemia	N
110	F	28	N	23,4		N
111	F	63	M	26,9		N
112	F	83	B	25,6	Hipotireoidismo,HAS	N
113	M	56	B	32,2		*
114	F	69	M	*		*
115	F	61	B	33,6		N
116	F	73	B	29,3	HAS	N
117	F	60	B	25,2	Nevralgia de trigêmio, HAS	N
118	F	54	M	29,1	HAS, hipertireodismo, transplante hepático	N
119	F	63	B	26,4	AR, hipotireoidismo	N
120	M	49	M	30,5		N
121	F	54	B	26,4	Osteoporose, fibromialgia	N
122	M	64	B	26,3	HAS	N
123	M	51	B	25,1		S
124	F	46	B	28,4	Anemia megaloblástica, urolitíase	S
125	M	66	B	24,5	Transplante hepático	N
126	M	51	B	25,0		S
127	F	69	B	34,2	Erisipela, HAS	N
128	M	48	B	26,6	Esquistossomose HE, HAS	S
129	M	58	B	29,1	Transplante hepático	S
130	M	43	B	21,1	Transplante renal	N
131	M	49	B	23,0		N
132	M	55	B	25,7	Blastomicose sul-americana	*
133	M	57	B	*		*
134	M	64	B	27,5	Hemangioma, osteoartrose	*

Anexo 6.4.1 Lista de Casos, Características Demográficas e Clínicas

135	M	33	B	28,9	HAS, transplante hepático	S
136	M	67	B	33,4	HAS, transplante hepático	N
137	M	55	B	19,7	Hipertensão portal	S
138	M	42	B	29,4		S
139	M	49	B	32,6	HAS, DAAT, transplante hepático	*
140	M	40	M	*	SIDA, pancreatite	S
141	M	76	B	23,8		S
142	M	46	B	34,7		S
143	M	48	B	39,7	Tumor orelha, IRC, HAS	S
144	M	46	M	*		S
145	M	43	B	*	Transplante hepático	*
146	M	53	B	31,1	HAS	N
147	M	71	B	26,2	Glaucoma	N
148	M	30	B	23,2		S
149	M	58	B	23,3		*
150	M	56	N	23,2	hemólise (hemocromatose secundária)	*
151	m	57	B	22,8	Hipertensão portal	*
152	F	41	N	*	Tumor de mama	*
153	F	46	B	30,4		N
154	F	54	B	20,0	Hipotireoidismo, anemia falciforme	N
155	F	56	B	18,7		N
156	F	48	B	*	Transplante hepático	*
157	F	72	B	24,1		N
158	M	28	B	24,5	Linfoma não Hodgkin, polineuropatia	N
159	F	52	A	25,5	Transplante fígado-rim, HAS	N
160	F	44	B	39,3	Nódulo tireóide, queimadura extensa	N
161	F	71	B	23,6	Psoríase, hipotireoidismo	N

Anexo 6.4.1 Lista de Casos, Características Demográficas e Clínicas

162	M	34	N	27,4		*
163	M	46	N	19,3	Tuberculose pulmonar, IRC	S
164	F	42	M	21,1	Transplante renal, hipotireodismo	N
165	F	47	B	34,3		N
166	M	69	B	*		*
167	F	54	B	30,4		N
168	M	47	B	34,9	Dislipidemia	S
169	M	51	B	24,7	Nefropatia	S
170	M	59	B	22,5		S
171	M	50	B	30,8		N
172	M	52	B	27,4		N
173	M	44	B	29,7		S
174	M	51	M	27,6		S
175	M	55	B	22,8	Transplante hepático	S
176	M	47	M	24,6	Esquistossomose HE	*
177	M	56	A	28,9		N
178	M	70	B	19,1	Cardiopata, esquizofrenia	*
179	F	52	N	28,8	Porfiria cutânea tardia	N
180	F	69	N	28,8	HAS, glaucoma, tireodectomia	N
181	F	55	B	27,6	Tumor de mama, fístula anal	N
182	F	44	N	23,4	Tromboastenia Glassman, esplenectomia	N
183	F	64	N	21,6		N
184	F	53	B	22,1		N
185	F	69	B	28,4	HAS, tubérculos, hipertireodismo	N
186	F	51	M	21,1	IRC	N
187	F	70	B	24,3	Hipotireodismo	N
188	F	66	M	23,2		N

Anexo 6.4.1 Lista de Casos, Características Demográficas e Clínicas

189	F	59	B	27,7	Leishmaniose nasal tratada, HAS	N
190	F	76	B	27,6	Osteoporose	N
191	F	64	B	22,4	Hipotireodismo, glaucoma, dislipidemia	N
192	F	53	B	18,3	HAS, fibromialgia, esôfago Barrett	N
193	F	67	B	21,5	Tuberculose cerebral, neurocisticercose	N
194	F	67	B	*	Transplante hepático	*
195	F	59	B	26,7	LES, osteoporose, hipotireodismo, RCUI	N
196	F	66	B	24,8	Hepatite A, HAS, valvulopatia mitral	N
197	F	57	B	30,1	Dislipidemia, HAS	S
198	F	51	B	24,5		N
199	F	59	B	30,0	HAS, insuficiência venosa periférica	N
200	F	65	B	24,1		N
201	F	62	B	17,2	Doença de Crohn	N
202	F	69	B	22,4	HAS, osteoporose, hipotireodismo	N
203	F	66	B	24,0		N
204	F	50	B	32,5	HAS	N
205	F	53	M	26,1	IRC	N
206	M	62	B	27,6	HAS	N
207	F	35	N	28,3		N
208	F	66	M	29,1		S
209	F	55	B	29,5	DPOC, IRC	N
210	F	36	N	23,0		N
211	F	49	B	*	Transplante hepático	*
212	F	58	B	25,7		N
213	M	67	A	18,4		S
214	F	72	B	35,6	Vitiligo, liquen, hipoacusia	N
215	M	68	B	22,2	Porfíria Cutânea Tardia	S

Anexo 6.4.1 Lista de Casos, Características Demográficas e Clínicas

216	M	61	M	30,8		N
217	M	47	B	25,7		*
218	M	60	M	22,8	Hemangioma	S
219	M	43	B	28,7	Porfiria Cutânea Tardia	S
220	M	54	B	28,0	Dislipidemia	S
221	F	54	M	25,1	HAS, osteoporose, hipotireodismo, vasculite	N
222	M	34	M	24,2		S
223	F	54	B	35,2	LES, hipotireodismo	N
224	F	58	B	24,1		S
225	F	67	B	24,1		S
226	M	37	B	20,7		S
227	M	61	B	22,1		*
228	F	46	B	20,8		N
229	F	55	B	27,6	Síndrome piramidal, cisto renal	N
230	F	69	A	*		N
231	M	42	B	28,1		N
232	M	50	B	31,2	Transplante hepático	S
233	M	54	B	23,0	Piodermite	S
234	M	55	B	30,7		S
235	M	49	B	*		*
236	M	39	B	23,1		N
237	M	50	B	*		*
238	M	43	B	24,4		S
239	F	35	B	25,6		S
240	F	27	B	26,0		N
241	F	27	B	36,5	Dislipidemia	S
242	M	50	B	22,8	Pancreatite biliar, transplante hepático	S

Anexo 6.4.1 Lista de Casos, Características Demográficas e Clínicas

243	F	24	M	31,7		N
244	F	38	B	22,3		N
245	F	45	M	28,5		N
246	M	65	B	25,2	Transplante hepático	S
247	M	49	B	*	Transplante hepático	S
248	M	58	B	28,0	Aneurisma mesentérico roto	S
249	M	47	M	31,2		S
250	M	52	A	20,1		S
251	M	24	B	17,8		N
252	M	50	B	38,8	HAS, arritmia, obesidade mórbida	S
253	F	60	B	28,4		N
254	F	64	N	*		*
255	F	56	B	26,0	HAS, sínd. Steven-Jonhson, transplante hepático	S
256	F	51	B	30,1		N
257	F	35	B	27,3		N
258	F	55	B	29,4		N
259	M	55	B	27,5		*
260	F	37	B	25,0		N
261	M	35	B	32,7	Transplante hepático	N
262	M	53	B	27,5	HAS	N
263	M	41	B	28,8		*
264	M	46	B	34,0	Obesidade	S
265	M	49	B	36,1	HAS, hemorróidas grau III	S
266	M	50	B	30,1		S
267	F	31	N	22,5	Anemia ferropriva	N
268	F	52	B	33,9	Hipotireodismo	N
269	F	44	B	42,2		N

Anexo 6.4.1 Lista de Casos, Características Demográficas e Clínicas

270	M	59	B	22,8	IRA por droga	N
271	F	53	B	22,6		N
272	F	52	B	28,7		N
273	F	57	A	29,6	Mal de Alzheimer	N
274	M	73	B	*	Hemangioma	N
275	F	40	B	23,4		N
276	F	42	B	24,8		S
277	F	71	B	20,4	HAS, doença de Chagas	N
278	M	38	B	23,9		*
279	F	63	A	25,7		N
280	M	48	B	26,5	AntiHBc reagente	N
281	M	52	B	31,8		*
282	F	46	B	*		*
283	F	63	B	33,3	Hemocromatose secundária	N
284	M	50	B	27,7	Doença de Crohn	*
285	M	46	B	19,8	Abcesso hepático tratado	N
286	F	28	B	20,2		N
287	F	58	B	38,1	IRC	N
288	M	25	B	17,7		*
289	F	32	B	19,7	Hepatite crônica VHB	N
290	F	67	B	26,8	IRC	N
291	F	60	B	26,7	Hipertireodismo, arritmia	N
292	M	33	B	22,1	Síndrome de Gilbert	N
293	M	45	B	32,0	NASH, transplante hepático	S
294	F	57	M	30,3		N
295	M	20	B	22,1	Transplante hepático	N
296	M	60	B	*	Transplante hepático	*

Anexo 6.4.1 Lista de Casos, Características Demográficas e Clínicas

297	M	58	B	26,5		S
298	M	68	B	*		*
299	M	68	M	23,5		*
300	F	68	B	26,0	HAS	N
301	M	63	B	30,8	Adenoma tubular de cólon	S
302	F	56	M	33,7	Porfiria cutânea tardia	N
303	F	70	B	36,5	Fibrilação atrial, dislipidemia	S
304	F	59	B	33,1		N
305	M	52	B	*		N
306	M	45	B	21,4	Deficiência de IgA	N
307	M	63	B	27,5	Úlcera duodenal	N
308	F	66	M	28,9	HAS	N
309	F	59	B	32,7		N
310	M	51	M	26,1	Porfiria cutânea tardia	S
311	M	37	M	33,7	HAS	*
312	M	65	B	19,4	Transplante renal, hepatite VHB soroconvertido	N
313	M	67	B	22,7	Insuficiência coronariana, HAS, plaquetopenia	*
314	M	56	B	25,0	Porfiria cutânea tardia	S
315	M	45	B	41,0	IRC	S
316	M	53	B	31,2		N
317	M	53	B	27,1	Tumor esôfago, metástase pancreática, IRA	S
318	F	49	B	21,4	IRC, HAS, hipotireodismo	N
319	M	62	B	27,9	Esquistossomose HE	S
320	F	72	B	34,6		N

Nota: * dados pendentes, gênero M= masculino, F= feminino; S= sim, N= não, DM= diabetes mellitus, HAS= hipertensão arterial sistêmica
FAF= ferimento por arma de fogo, HE= hepato-esplência, IRA/IRC= insuficiência renal aguda/crônica, AR= artrite reumatóide
LES= lupus eritematose sistêmico, NASH= Esteato-hepatite não alcoólica, RCUI= retocolite ulcerativa idiopática, Tb= Tuberculose

ANEXO 6.5.2 Resultados de Fibrose, Sobrecarga Bioquímica e Tecidual de Ferro e Genotipagem

CASO	FIBROSE	SIDEROSE	CHC	FERRO	SAT FE	FERRITINA	C282Y	H63D
1	4	0	N	92	23%	19	0	0
2	1	0	N	55	22%	141	0	1
3	2	0	N	231	79%	3879	0	0
4	4	*	N	97	36%	99	0	1
5	2	0	N	269	90%	*	0	0
6	2	0	N	257	93%	1300	0	0
7	4	0	N	96	26%	66	0	0
8	4	0	S	131	69%	431	0	0
9	2	0	N	157	63%	786	0	1
10	3	*	N	186	68%	746	1	1
11	2	*	N	111	24%	95	0	0
12	0	0	N	135	42%	212	0	0
13	4	*	N	176	58%	514	0	1
14	4	0	N	59	24%	104	0	0
15	2	0	N	133	37%	140	0	0
16	3	0	N	110	41%	92	1	0
17	1	0	N	85	*	68	0	0
18	4	1	N	232	95%	195	0	0
19	4	0	S	197	59%	1164	0	0
20	0	0	N	128	31%	*	0	0
21	4	2	N	139	69%	559	0	0
22	1	0	N	191	63%	508	0	0
23	4	*	N	127	41%	118	0	1
24	4	0	N	298	87%	2590	0	1
25	2	0	N	165	49%	473	0	0
26	1	0	N	162	56%	606	0	1

ANEXO 6.5.2 Resultados de Fibrose, Sobrecarga Bioquímica e Tecidual de Ferro e Genotipagem

27	4	0	N	219	83%	167	0	0
28	4	0	S	118	51%	558	0	0
29	0	0	N	170	53%	428	0	0
30	4	3	N	195	98%	3408	2	0
31	4	*	S	133	32%	182	0	1
32	3	*	N	88	27%	*	0	1
33	4	0	N	99	23%	122	0	1
34	1	0	N	54	16%	88	0	0
35	1	4	N	226	95%	9170	0	1
36	4	0	N	251	58%	921	0	0
37	4	2	N	286	68%	968	0	1
38	1	0	N	91	28%	10	0	0
39	2	0	N	160	58%	788	0	0
40	4	0	N	167	62%	1809	0	1
41	0	0	N	104	32%	72	0	1
42	1	0	N	131	36%	399	1	0
43	2	0	N	77	27%	56	0	0
44	4	*	N	144	55%	1529	0	1
45	2	0	N	131	38%	188	0	0
46	2	0	N	135	37%	588	0	0
47	4	*	N	93	97%	3023	0	0
48	1	0	N	161	42%	170	0	0
49	3	0	N	111	32%	228	0	0
50	3	0	N	143	39%	*	0	0
51	0	0	N	322	97%	651	0	1
52	4	*	N	167	55%	782	0	0
53	3	0	N	80	*	300	0	0

ANEXO 6.5.2 Resultados de Fibrose, Sobrecarga Bioquímica e Tecidual de Ferro e Genotipagem

54	4	*	N	166	48%	234	0	0
55	1	0	N	99	23%	40	0	0
56	4	0	N	82	22%	29	0	0
57	1	0	N	77	26%	75	1	0
58	1	0	N	63	17%	*	0	1
59	4	*	S	179	82%	139	0	0
60	2	1	N	108	33%	542	0	1
61	4	0	S	*	*	*	0	0
62	1	2	N	287	96%	1846	0	0
63	4	0	S	180	53%	448	0	0
64	3	0	N	147	37%	530	0	0
65	3	0	N	399	99%	241	0	0
66	4	0	N	197	61%	415	0	0
67	4	*	N	307	72%	217	0	0
68	1	0	N	54	11%	23	0	1
69	1	1	N	254	93%	264	2	0
70	2	0	N	55	17%	234	0	0
71	4	0	S	142	77%	108	0	1
72	2	*	N	220	51%	215	0	2
73	1	0	N	198	56%	474	0	0
74	0	2	N	113	47%	779	0	0
75	3	0	S	221	68%	650	0	1
76	4	0	N	103	34%	77	0	0
77	2	0	N	98	34%	87	0	0
78	4	*	N	132	42%	587	0	0
79	0	0	N	78	29%	178	0	0
80	1	4	N	36	18%	593	0	0

ANEXO 6.5.2 Resultados de Fibrose, Sobrecarga Bioquímica e Tecidual de Ferro e Genotipagem

81	2	3	N	240	77%	2168	0	0
82	4	2	S	76	42%	528	1	0
83	4	4	N	225	99%	6379	0	0
84	3	1	N	180	54%	232	0	0
85	1	0	N	97	0%	416	0	0
86	2	0	N	126	46%	378	0	0
87	2	2	N	105	32%	852	0	1
88	3	0	N	81	24%	117	0	0
89	3	0	S	89	78%	1011	0	1
90	2	3	N	229	93%	1167	0	1
91	2	0	N	254	76%	944	0	0
92	2	0	N	114	43%	129	0	0
93	4	0	N	111	35%	*	0	0
94	4	*	N	161	73%	622	0	1
95	4	0	S	109	36%	81	0	0
96	2	0	N	206	62%	1059	0	0
97	4	0	N	197	78%	774	0	1
98	3	0	S	140	49%	1220	0	0
99	1	3	N	235	75%	679	0	0
100	3	0	N	68	19%	47	0	1
101	4	1	N	122	98%	317	0	1
102	1	0	N	138	43%	477	0	0
103	2	0	N	245	83%	57	0	2
104	4	*	N	182	95%	1099	0	1
105	2	0	N	108	33%	352	0	0
106	2	0	N	142	49%	239	0	1
107	3	0	S	101	29%	132	0	0

ANEXO 6.5.2 Resultados de Fibrose, Sobrecarga Bioquímica e Tecidual de Ferro e Genotipagem

108	1	0	N	57	18%	100	0	0
109	2	0	N	90	46%	671	0	0
110	1	0	N	40	16%	90	0	0
111	2	1	N	182	60%	275	0	0
112	4	*	N	86	21%	38	0	0
113	2	0	N	295	78%	528	0	0
114	3	0	N	101	29%	57	0	0
115	1	0	N	101	27%	91	0	0
116	4	*	N	207	69%	32	0	1
117	4	0	N	20	7%	8	0	1
118	4	0	S	76	26%	112	0	0
119	2	0	N	91	26%	116	0	0
120	1	0	N	144	40%	517	0	1
121	0	0	N	95	30%	*	0	0
122	2	0	N	111	33%	550	0	1
123	2	1	N	277	77%	625	2	0
124	1	0	N	66	30%	106	0	0
125	4	0	S	56	14%	9	0	0
126	4	0	N	175	0%	564	0	0
127	4	*	N	137	48%	227	0	0
128	4	0	N	259	99%	676	0	0
129	4	0	S	73	20%	141	0	0
130	0	0	N	85	28%	55	0	0
131	3	0	N	162	59%	299	0	1
132	2	1	N	167	52%	625	0	0
133	4	0	N	166	98%	811	0	0
134	1	0	N	66	23%	60	0	0

ANEXO 6.5.2 Resultados de Fibrose, Sobrecarga Bioquímica e Tecidual de Ferro e Genotipagem

135	4	0	N	190	47%	1063	0	0
136	4	0	S	42	48%	868	0	0
137	4	0	N	146	59%	2472	0	1
138	3	0	N	265	74%	991	0	1
139	4	*	S	160	42%	135	0	2
140	4	0	N	273	97%	1101	0	0
141	4	0	S	60	17%	25	0	1
142	4	0	N	233	98%	1393	0	0
143	4	0	N	52	36%	603	0	0
144	1	0	N	150	48%	382	0	0
145	4	2	S	164	63%	903	0	0
146	1	0	N	178	56%	1163	0	0
147	2	0	N	201	49%	218	0	0
148	2	0	S	150	50%	392	0	0
149	1	0	N	113	0%	35	0	0
150	3	0	N	293	98%	2970	0	0
151	4	*	N	205	66%	476	0	0
152	2	4	N	221	94%	5817	0	0
153	3	0	N	125	9%	489	0	1
154	1	0	N	118	41%	278	0	0
155	2	0	N	154	53%	185	0	0
156	4	0	N	145	43%	40	0	0
157	4	0	N	202	61%	455	0	0
158	2	1	N	189	97%	1582	0	0
159	4	0	N	67	16%	11	0	0
160	2	0	N	110	26%	61	0	1
161	4	0	N	229	85%	387	0	1

ANEXO 6.5.2 Resultados de Fibrose, Sobrecarga Bioquímica e Tecidual de Ferro e Genotipagem

162	1	0	N	161	63%	121	0	1
163	4	*	N	67	93%	1612	0	0
164	1	3	N	230	96%	4608	0	0
165	3	0	N	135	57%	97	1	0
166	4	0	S	204	60%	245	0	0
167	4	*	N	87	22%	55	0	0
168	4	0	N	147	44%	1052	0	2
169	2	0	N	247	75%	1054	0	0
170	4	*	S	124	57%	156	0	0
171	4	0	N	42	71%	545	0	0
172	2	0	N	125	38%	35	0	0
173	4	0	N	199	72%	2800	0	0
174	0	0	N	166	49%	*	0	0
175	4	0	S	25	50%	8	0	0
176	4	0	N	282	68%	1281	0	0
177	4	*	S	269	100%	376	0	0
178	0	0	N	58	19%	42	0	0
179	1	3	N	166	61%	133	0	1
180	2	0	N	148	*	501	0	0
181	1	0	N	102	37%	27	0	0
182	1	0	N	102	32%	270	0	0
183	4	0	S	256	97%	2185	1	1
184	3	0	N	129	30%	157	0	0
185	1	0	N	79	22%	84	0	0
186	1	4	N	60	28%	1099	0	0
187	1	2	N	185	63%	1245	0	2
188	4	0	N	159	42%	113	0	0

ANEXO 6.5.2 Resultados de Fibrose, Sobrecarga Bioquímica e Tecidual de Ferro e Genotipagem

189	3	0	N	80	25%	285	1	1
190	4	0	N	104	40%	376	0	0
191	3	0	N	171	47%	*	0	0
192	1	0	N	52	50%	9	0	0
193	2	0	N	92	32%	108	0	0
194	4	0	S	89	24%	62	0	0
195	0	0	N	116	43%	83	1	1
196	3	0	N	243	65%	474	0	0
197	2	0	N	126	44%	76	0	0
198	4	0	N	237	73%	128	0	0
199	3	0	S	204	49%	154	0	1
200	4	0	N	130	31%	*	0	0
201	3	0	N	57	19%	58	0	0
202	2	0	N	78	23%	160	0	0
203	4	0	N	142	41%	18	0	0
204	1	0	N	181	56%	1087	0	0
205	1	3	N	108	50%	2387	0	0
206	3	0	N	215	79%	2706	0	0
207	3	0	N	125	39%	64	1	0
208	1	0	N	70	29%	190	0	0
209	3	0	N	98	25%	315	0	0
210	2	0	N	149	36%	189	0	0
211	4	0	S	61	27%	80	0	0
212	3	0	N	172	47%	539	0	0
213	4	0	N	241	92%	916	0	0
214	4	0	N	234	77%	708	0	2
215	4	0	S	116	44%	494	0	1

ANEXO 6.5.2 Resultados de Fibrose, Sobrecarga Bioquímica e Tecidual de Ferro e Genotipagem

216	2	0	N	264	76%	170	0	1
217	4	*	N	38	9%	6	0	0
218	4	0	N	194	68%	2177	0	0
219	4	0	N	181	69%	1858	0	1
220	2	0	N	244	55%	333	0	0
221	1	0	N	74	23%	63	0	0
222	1	0	N	212	72%	287	0	0
223	1	0	N	116	33%	*	0	1
224	2	0	N	288	99%	754	0	0
225	4	0	S	288	99%	754	0	1
226	1	*	N	152	51%	298	0	1
227	3	0	N	122	56%	211	0	0
228	2	0	N	134	40%	296	0	0
229	2	0	N	223	84%	433	0	0
230	3	1	N	191	80%	1204	0	0
231	2	0	N	147	33%	47	0	0
232	2	1	N	297	92%	1307	0	2
233	3	0	N	77	24%	*	0	1
234	4	0	S	225	45%	861	0	1
235	2	0	N	137	34%	256	0	0
236	2	2	N	161	49%	650	0	0
237	4	0	N	300	86%	1678	1	1
238	4	0	S	48	13%	17	0	0
239	2	0	N	156	44%	210	0	0
240	2	0	N	130	39%	45	0	0
241	1	0	N	85	29%	42	0	1
242	4	0	S	196	54%	353	0	1

ANEXO 6.5.2 Resultados de Fibrose, Sobrecarga Bioquímica e Tecidual de Ferro e Genotipagem

243	2	0	N	45	10%	34	0	1
244	2	0	N	126	*	147	0	0
245	1	0	N	84	20%	28	0	0
246	2	0	N	131	41%	955	0	0
247	4	2	S	254	97%	2322	0	0
248	2	0	N	201	49%	393	0	0
249	3	0	N	264	77%	343	0	0
250	3	0	N	121	44%	453	0	0
251	1	0	N	154	51%	486	0	0
252	4	0	N	171	78%	754	0	0
253	4	*	N	246	79%	618	0	1
254	4	*	S	231	98%	639	1	0
255	4	0	S	111	31%	211	0	0
256	1	0	N	93	24%	99	0	0
257	4	0	N	311	94%	465	0	0
258	4	1	N	174	71%	131	0	1
259	4	0	N	103	26%	177	0	1
260	2	0	N	110	29%	78	0	0
261	4	2	S	207	96%	1380	1	0
262	2	0	N	129	32%	732	0	0
263	4	0	N	101	*	663	0	0
264	3	0	N	203	83%	638	0	0
265	4	0	N	63	67%	1736	0	1
266	1	0	N	183	46%	295	0	0
267	1	0	N	55	12%	5	0	0
268	0	0	N	112	*	182	0	0
269	1	0	N	142	40%	114	0	0

ANEXO 6.5.2 Resultados de Fibrose, Sobrecarga Bioquímica e Tecidual de Ferro e Genotipagem

270	2	0	N	157	52%	926	0	0
271	1	1	N	291	83%	633	0	0
272	1	0	N	120	40%	120	0	0
273	2	0	N	101	29%	238	0	0
274	3	0	N	230	95%	2319	0	0
275	2	0	N	210	57%	127	0	0
276	3	0	N	305	77%	174	0	0
277	4	0	N	47	10%	18	0	0
278	1	0	N	129	39%	166	0	0
279	4	0	S	196	61%	379	0	0
280	2	0	N	172	61%	598	0	0
281	4	0	N	263	92%	557	0	0
282	1	0	N	75	0%	49	0	1
283	4	1	N	203	72%	508	0	0
284	2	0	N	132	40%	128	0	1
285	2	0	N	94	35%	199	0	2
286	1	0	N	82	22%	179	0	1
287	2	0	N	79	28%	77	0	0
288	0	0	N	84	24%	104	0	0
289	2	0	N	67	65%	65	0	0
290	0	0	N	103	30%	336	0	0
291	2	0	N	206	43%	325	0	0
292	3	3	N	233	99%	2310	0	0
293	4	0	S	243	99%	1073	1	0
294	3	1	N	138	39%	447	0	1
295	4	3	S	147	47%	1023	0	1
296	4	*	N	161	64%	75	0	0

ANEXO 6.5.2 Resultados de Fibrose, Sobrecarga Bioquímica e Tecidual de Ferro e Genotipagem

297	3	2	N	191	61%	412	0	1
298	2	0	N	128	41%	193	0	0
299	4	*	N	65	10%	1916	0	0
300	3	0	S	159	44%	218	0	1
301	1	1	N	83	37%	1674	1	0
302	1	0	N	159	53%	627	0	1
303	4	0	S	89	32%	259	0	0
304	1	0	N	184	62%	181	0	0
305	4	0	N	*	75%	580	0	2
306	4	0	N	190	58%	54	0	1
307	4	*	N	214	99%	952	0	0
308	4	*	N	96	27%	94	0	0
309	1	0	N	184	62%	181	0	0
310	1	0	N	147	46%	578	0	0
311	1	0	N	121	32%	533	0	0
312	4	0	S	48	19%	174	0	1
313	4	*	S	45	62%	766	0	0
314	3	0	N	143	39%	452	0	0
315	4	*	N	138	79%	713	0	0
316	2	0	N	32	6%	7	0	0
317	4	*	N	70	25%	64	0	0
318	4	*	S	141	48%	186	0	0
319	4	*	N	177	85%	1278	1	0
320	2	*	N	123	30%	135	0	0

Nota: * dados pendentes, N= não, S= sim, NR= não relatado

Ferro em microg/dL, Ferritina em ng/mL, Saturação de Ferro da Transferrina (SAT FE)

Anexo 6.5 Constituição do Grupo Caso-Control

CASO CONTROLE		CASO CONTROLE		CASO CONTROLE		CASO CONTROLE		CASO CONTROLE	
4	256	120	8	285	41	116	190	87	266
9	108	122	25	293	146	117	1	90	64
10	280	123	126	295	158	153	204	94	39
13	135	131	81	297	133	160	269	97	171
16	206	163	21	301	248	161	157	100	246
23	67	164	203	305	92	165	268	101	172
24	217	165	36	306	19	179	182	104	70
26	134	141	313	312	17	183	180	234	220
37	6	162	263	319	48	187	202	237	235
40	125	168	142	2	201	189	304	242	314
41	231	215	170	30	260	195	15	259	132
44	130	216	99	31	79	199	88	261	12
51	28	219	54	35	186	207	210	265	143
60	76	226	84	42	181	214	320	284	56
71	270	232	129	57	272	223	121	68	245
82	175	72	49	75	156	89	105	103	289
106	18	241	197	243	43	253	291	254	188
258	229	282	124	69	14	225	193	233	102
58	11								

Nota: Os números referem-se aos da lista de casos estudados (Vide Anexos 6.4.1 e 6.4.2)

7. REFERÊNCIAS

1. Adams, PC, Reboussin, DM, Barton, JC, McLaren, CE, Eckfeldt, JH, McLaren, GD, Dawkins, FW, et al. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med*. 2005;352:1769-78.
2. Agostinho, MF, Arruda, VR, Basseres, DS, Bordin, S, Soares, MC, Menezes, RC, Costa, FF, et al. Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. *Blood Cells Mol Dis*. 1999;25:324-7.
3. Aoki, CA, Rossaro, L, Ramsamooj, R, Brandhagen, D, Burritt, MF, Bowlus, CL. Liver hepcidin mRNA correlates with iron stores, but not inflammation, in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39:71-4.
4. Arber, N, Konikoff, FM, Moshkowitz, M, Baratz, M, Hallak, A, Santo, M, Halpern, Z, et al. Increased serum iron and iron saturation without liver iron accumulation distinguish chronic hepatitis C from other chronic liver diseases. *Dig Dis Sci*. 1994;39:2656-9.
5. Bedossa, P, Poynard, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996;24:289-93.
6. Blanc, JF, De Ledinghen, V, Bernard, PH, de Verneuil, H, Winnock, M, Le Bail, B, Carles, J, et al. Increased incidence of HFE C282Y mutations in patients with iron overload and hepatocellular carcinoma developed in non-cirrhotic liver. *J Hepatol*. 2000;32:805-11.
7. Boige, V, Castera, L, de Roux, N, Ganne-Carrie, N, Ducot, B, Pelletier, G, Beaugrand, M, et al. Lack of association between HFE gene mutations and hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Gut*. 2003;52:1178-81.
8. Bonkovsky, HL, Naishadham, D, Lambrecht, RW, Chung, RT, Hoefs, JC, Nash, SR, Rogers, TE, et al. Roles of iron and HFE mutations on severity and response to therapy during retreatment of advanced chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2006;131:1440-51.
9. Bonkovsky, HL, Troy, N, McNeal, K, Banner, BF, Sharma, A, Obando, J, Mehta, S, et al. Iron and HFE or TfR1 mutations as comorbid factors for development and progression of chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2002;37:848-54.
10. Britton, RS, Bacon, BR, Recknagel, RO. Lipid peroxidation and associated hepatic organelle dysfunction in iron overload. *Chem Phys Lipids*. 1987;45:207-39.

11. Bruix, J, Llovet, JM. HCC surveillance: who is the target population? *Hepatology*. 2003;37:507-9.
12. Burra, P. Hepatitis C. *Semin Liver Dis*. 2009;29:53-65.
13. Campiotto, S, Pinho, JR, Carrilho, FJ, Da Silva, LC, Souto, FJ, Spinelli, V, Pereira, LM, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38:41-9.
14. Caraceni, P, Fagiuoli, S, Van Thiel, DH. Iron reduction therapy: simply camouflage, or a real weapon? *Am J Gastroenterol*. 1994;89:970-3.
15. Cardoso, CS, de Sousa, M. HFE, the MHC and hemochromatosis: paradigm for an extended function for MHC class I. *Tissue Antigens*. 2003;61:263-75.
16. Chomczynski, P, Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-9.
17. Di Bisceglie, AM, Axiotis, CA, Hoofnagle, JH, Bacon, BR. Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology*. 1992;102:2108-13.
18. Diwakaran, HH, Befeler, AS, Britton, RS, Brunt, EM, Bacon, BR. Accelerated hepatic fibrosis in patients with combined hereditary hemochromatosis and chronic hepatitis C infection. *J Hepatol*. 2002;36:687-91.
19. Drakesmith, H, Prentice, A. Viral infection and iron metabolism. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:541-52.
20. Erhardt, A, Maschner-Olberg, A, Mellenthin, C, Kappert, G, Adams, O, Donner, A, Willers, R, et al. HFE mutations and chronic hepatitis C: H63D and C282Y heterozygosity are independent risk factors for liver fibrosis and cirrhosis. *J Hepatol*. 2003;38:335-42.
21. Fargion, S, Fracanzani, AL, Rossini, A, Borzio, M, Riggio, O, Belloni, G, Bissoli, F, et al. Iron reduction and sustained response to interferon-alpha therapy in patients with chronic hepatitis C: results of an Italian multicenter randomized study. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:1204-10.
22. Fargion, S, Stazi, MA, Fracanzani, AL, Mattioli, M, Sampietro, M, Tavazzi, D, Bertelli, C, et al. Mutations in the HFE gene and their

interaction with exogenous risk factors in hepatocellular carcinoma. *Blood Cells Mol Dis*. 2001;27:505-11.

23. Feder, JN, Gnirke, A, Thomas, W, Tsuchihashi, Z, Ruddy, DA, Basava, A, Dormishian, F, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*. 1996;13:399-408.

24. Focaccia, R, Baraldo, DC, Ferraz, ML, Martinelli, AL, Carrilho, FJ, Goncales, FL, Jr., Pedroso, ML, et al. Demographic and anthropometrical analysis and genotype distribution of chronic hepatitis C patients treated in public and private reference centers in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2004;8:348-55.

25. Focaccia, R, da Conceicao, OJ, Sette, H, Jr., Sabino, E, Bassit, L, Nitrini, DR, Lomar, AV, et al. Estimated Prevalence of Viral Hepatitis in the General Population of the Municipality of Sao Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population. *Braz J Infect Dis*. 1998;2:269-84.

26. Fontana, RJ, Israel, J, LeClair, P, Banner, BF, Tortorelli, K, Grace, N, Levine, RA, et al. Iron reduction before and during interferon therapy of chronic hepatitis C: results of a multicenter, randomized, controlled trial. *Hepatology*. 2000;31:730-6.

27. Fracanzani, AL, Fargion, S, Stazi, MA, Valenti, L, Amoroso, P, Cariani, E, Sangiovanni, A, et al. Association between heterozygosity for *HFE* gene mutations and hepatitis viruses in hepatocellular carcinoma. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;35:27-32.

28. Fujita, N, Horiike, S, Sugimoto, R, Tanaka, H, Iwasa, M, Kobayashi, Y, Hasegawa, K, et al. Hepatic oxidative DNA damage correlates with iron overload in chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med*. 2007;42:353-62.

29. Fujita, N, Takei, Y. Iron, hepatitis C virus, and hepatocellular carcinoma: iron reduction preaches the gospel for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol*. 2007;42:923-6.

30. Furutani, T, Hino, K, Okuda, M, Gondo, T, Nishina, S, Kitase, A, Korenaga, M, et al. Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology*. 2006;130:2087-98.

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

-
32. Gehrke, SG, Stremmel, W, Mathes, I, Riedel, HD, Bents, K, Kallinowski, B. Hemochromatosis and transferrin receptor gene polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on iron status, liver injury and HCV genotype. *J Mol Med*. 2003;81:780-7.
 33. Geier, A, Reugels, M, Weiskirchen, R, Wasmuth, HE, Dietrich, CG, Siewert, E, Garton, C, et al. Common heterozygous hemochromatosis gene mutations are risk factors for inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2004;24:285-94.
 34. Gochee, PA, Powell, LW, Cullen, DJ, Du Sart, D, Rossi, E, Olynyk, JK. A population-based study of the biochemical and clinical expression of the H63D hemochromatosis mutation. *Gastroenterology*. 2002;122:646-51.
 35. Griffiths, A, Olynyk, JK. Iron and the response to treatment of hepatitis C. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:788-90.
 36. Griffiths, W, Cox, T. Haemochromatosis: novel gene discovery and the molecular pathophysiology of iron metabolism. *Hum Mol Genet*. 2000;9:2377-82.
 37. Guyader, D, Thirouard, AS, Erdtmann, L, Rakba, N, Jacquelinet, S, Danielou, H, Perrin, M, et al. Liver iron is a surrogate marker of severe fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2007;46:587-95.
 38. Hellerbrand, C, Poppl, A, Hartmann, A, Scholmerich, J, Lock, G. HFE C282Y heterozygosity in hepatocellular carcinoma: evidence for an increased prevalence. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2003;1:279-84.
 39. Hoofnagle, JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology*. 1997;26:15S-20S.
 40. Kakizaki, S, Takagi, H, Horiguchi, N, Toyoda, M, Takayama, H, Nagamine, T, Mori, M, et al. Iron enhances hepatitis C virus replication in cultured human hepatocytes. *Liver*. 2000;20:125-8.
 41. Kazemi-Shirazi, L, Datz, C, Maier-Dobersberger, T, Kaserer, K, Hackl, F, Polli, C, Steindl, PE, et al. The relation of iron status and hemochromatosis gene mutations in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 1999;116:127-34.
 42. Ladero, JM, Ropero, P, Ortega, L, Taxonera, C, Gonzalez, FA, Lopez-Alonso, G, Briceno, O, et al. [HFE gene mutations, hepatic iron content, and histological severity in hepatitis C virus-induced chronic hepatitis]. *Rev Esp Enferm Dig*. 2003;95:829-36.

43. Lebray, P, Zylberberg, H, Hue, S, Poulet, B, Carnot, F, Martin, S, Chretien, Y, et al. Influence of HFE gene polymorphism on the progression and treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2004;11:175-82.
44. Loreal, O, Deugnier, Y, Moirand, R, Lauvin, L, Guyader, D, Jouanolle, H, Turlin, B, et al. Liver fibrosis in genetic hemochromatosis. Respective roles of iron and non-iron-related factors in 127 homozygous patients. *J Hepatol.* 1992;16:122-7.
45. Mah, YH, Kao, JH, Liu, CJ, Chen, CL, Chen, PJ, Lai, MY, Chen, DS. Prevalence and clinical implications of HFE gene mutations (C282Y and H63D) in patients with chronic hepatitis B and C in Taiwan. *Liver Int.* 2005;25:214-9.
46. Martinelli. Ferro e hepatites virais crônicas. Relação com mutações no gene *HFE* e com fibrogênese hepática. [Livre-Docência apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP]. 2007.
47. Martinelli, AL, Franco, RF, Villanova, MG, Figueiredo, JF, Secaf, M, Tavella, MH, Ramalho, LN, et al. Are haemochromatosis mutations related to the severity of liver disease in hepatitis C virus infection? *Acta Haematol.* 2000;102:152-6.
48. Massard, J, Ratziu, V, Thabut, D, Moussalli, J, Lebray, P, Benhamou, Y, Poynard, T. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2006;44:S19-24.
49. McCaughan, GW, George, J. Fibrosis progression in chronic hepatitis C virus infection. *Gut.* 2004;53:318-21.
50. McHutchison, JG. Understanding hepatitis C. *Am J Manag Care.* 2004;10:S21-9.
51. Mueller, S, Afdhal, NH, Schuppan, D. Iron, HCV, and liver cancer: hard metal setting the pace? *Gastroenterology.* 2006;130:2229-34.
52. Nahon, P, Sutton, A, Rufat, P, Zioli, M, Thabut, G, Schischmanoff, PO, Vidaud, D, et al. Liver iron, HFE gene mutations, and hepatocellular carcinoma occurrence in patients with cirrhosis. *Gastroenterology.* 2008;134:102-10.
53. Negro, F, Samii, K, Rubbia-Brandt, L, Quadri, R, Male, PJ, Zarski, JP, Baud, M, et al. Hemochromatosis gene mutations in chronic hepatitis C patients with and without liver siderosis. *J Med Virol.* 2000;60:21-7.

-
54. Nelson, JE, Bhattacharya, R, Lindor, KD, Chalasani, N, Raaka, S, Heathcote, EJ, Miskovsky, E, et al. HFE C282Y mutations are associated with advanced hepatic fibrosis in Caucasians with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2007;46:723-9.
55. Nelson, N. Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO J*. 1999;18:4361-71.
56. Nemeth, E, Ganz, T. Heparin and iron-loading anemias. *Haematologica*. 2006;91:727-32.
57. Nishina, S, Hino, K, Korenaga, M, Vecchi, C, Pietrangelo, A, Mizukami, Y, Furutani, T, et al. Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology*. 2008;134:226-38.
58. Notaroberto, S. Estudo epidemiológico coorte-transversal de portadores de infecção pelo vírus da hepatite C: análise de 700 casos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2004.
59. Olynyk, JK, Reddy, KR, Di Bisceglie, AM, Jeffers, LJ, Parker, TI, Radick, JL, Schiff, ER, et al. Hepatic iron concentration as a predictor of response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 1995;108:1104-9.
60. Pantopoulos, K. Function of the hemochromatosis protein HFE: Lessons from animal models. *World J Gastroenterol*. 2008;14:6893-901.
61. Pereira, AC, Mota, GF, Krieger, JE. Hemochromatosis gene variants in three different ethnic populations: effects of admixture for screening programs. *Hum Biol*. 2001;73:145-51.
62. Pietrangelo, A. Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282:G403-14.
63. Pietrangelo, A. Hemochromatosis gene modifies course of hepatitis C viral infection. *Gastroenterology*. 2003;124:1509-23.
64. Piperno, A, Vergani, A, Malosio, I, Parma, L, Fossati, L, Ricci, A, Bovo, G, et al. Hepatic iron overload in patients with chronic viral hepatitis: role of HFE gene mutations. *Hepatology*. 1998;28:1105-9.
65. Pirisi, M, Toniutto, P, Uzzau, A, Fabris, C, Avellini, C, Scott, C, Apollonio, L, et al. Carriage of HFE mutations and outcome of surgical

resection for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. *Cancer*. 2000;89:297-302.

66. Powell, LW, Subramaniam, VN, Yapp, TR. Haemochromatosis in the new millennium. *J Hepatol*. 2000;32:48-62.

67. Poynard, T, Ratziu, V, Benhamou, Y, Opolon, P, Cacoub, P, Bedossa, P. Natural history of HCV infection. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2000;14:211-28.

68. 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.

69. Recalcati, S, Pometta, R, Levi, S, Conte, D, Cairo, G. Response of monocyte iron regulatory protein activity to inflammation: abnormal behavior in genetic hemochromatosis. *Blood*. 1998;91:2565-72.

70. Rigamonti, C, Andorno, S, Maduli, E, Capelli, F, Boldorini, R, Sartori, M. Gender and liver fibrosis in chronic hepatitis: the role of iron status. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;21:1445-51.

71. Riggio, O, Montagnese, F, Fiore, P, Folino, S, Giambartolomei, S, Gandin, C, Merli, M, et al. Iron overload in patients with chronic viral hepatitis: how common is it? *Am J Gastroenterol*. 1997;92:1298-301.

72. Ropero, P, Briceno, O, Lopez-Alonso, G, Agundez, JA, Gonzalez Fernandez, FA, Garcia-Hoz, F, Villegas Martinez, A, et al. [The H63D mutation in the *HFE* gene is related to the risk of hepatocellular carcinoma]. *Rev Esp Enferm Dig*. 2007;99:376-81.

73. Shan, Y, Lambrecht, RW, Bonkovsky, HL. Association of hepatitis C virus infection with serum iron status: analysis of data from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Clin Infect Dis*. 2005;40:834-41.

74. Shedlofsky, SI. Role of iron in the natural history and clinical course of hepatitis C disease. *Hepatogastroenterology*. 1998;45:349-55.

75. Sherrington, CA, Olynyk, JK. Iron as a cofactor in chronic hepatitis C infection. *Liver*. 2002;22:187-9.

76. Silva, IS, Perez, RM, Oliveira, PV, Cantagalo, MI, Dantas, E, Sisti, C, Figueiredo-Mendes, C, et al. Iron overload in patients with chronic hepatitis C virus infection: clinical and histological study. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005;20:243-8.

-
77. Silva, LK, Silva, MB, Lopes, GB, Rodart, IF, Costa, FQ, Santana, NP, Parana, R, et al. Prevalence of hepatitis C virus infection and HCV genotypes among hemophiliacs in the State of Bahia, Northeastern Brazil: analysis of serological and virological parameters. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38:496-502.
78. Smith, BC, Gorge, J, Guzail, MA, Day, CP, Daly, AK, Burt, AD, Bassendine, MF. Heterozygosity for hereditary hemochromatosis is associated with more fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1998;27:1695-9.
79. Souza, FF. Papel dos depósitos de ferro no fígado e das mutações no gene *HFE* (C282Y e H63D) como fatores preditivos de progressão da fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica [Dissertação de Mestrado]. 2007.
80. Thorburn, D, Curry, G, Spooner, R, Spence, E, Oien, K, Halls, D, Fox, R, et al. The role of iron and haemochromatosis gene mutations in the progression of liver disease in chronic hepatitis C. *Gut*. 2002;50:248-52.
81. Trinder, D, Ayonrinde, OT, Olynyk, JK. HCV, iron, and oxidative stress: the new choreography of hepcidin. *Gastroenterology*. 2008;134:348-51.
82. Valenti, L, Pulixi, EA, Arosio, P, Cremonesi, L, Biasiotto, G, Dongiovanni, P, Maggioni, M, et al. Relative contribution of iron genes, dysmetabolism and hepatitis C virus (HCV) in the pathogenesis of altered iron regulation in HCV chronic hepatitis. *Haematologica*. 2007;92:1037-42.
83. Van Thiel, DH, Friedlander, L, Molloy, PJ, Kania, RJ, Fagiuoli, S, Wright, HI, Gasbarrini, A, et al. Retreatment of hepatitis C interferon non-responders with larger doses of interferon with and without phlebotomy. *Hepatogastroenterology*. 1996;43:1557-61.
84. Vautier, G, Olynyk, JK. Porphyria cutanea tarda in the HFE-gene and hepatitis C virus era. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:3350-2.
85. Waheed, A, Parkkila, S, Saarnio, J, Fleming, RE, Zhou, XY, Tomatsu, S, Britton, RS, et al. Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:1579-84.
86. Waheed, A, Parkkila, S, Zhou, XY, Tomatsu, S, Tsuchihashi, Z, Feder, JN, Schatzman, RC, et al. Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with beta2-microglobulin,

intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:12384-9.

87. Wang, JH, Zheng, X, Ke, X, Dorak, MT, Shen, J, Boodram, B, O'Gorman, M, et al. Ethnic and geographical differences in HLA associations with the outcome of hepatitis C virus infection. *Virology*. 2009;6:46.

88. Weiss, G, Umlauft, F, Urbanek, M, Herold, M, Lovevsky, M, Offner, F, Gordeuk, VR. Associations between cellular immune effector function, iron metabolism, and disease activity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*. 1999;180:1452-8.

89. Weiss, G, Werner-Felmayer, G, Werner, ER, Grunewald, K, Wachter, H, Hentze, MW. Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *J Exp Med*. 1994;180:969-76.

90. Yano, K, Yatsushashi, H, Yano, M. [Epidemiology of hepatitis C in Japan]. *Nippon Rinsho*. 2004;62 Suppl 7:241-7.

91. Yano, M, Kumada, H, Kage, M, Ikeda, K, Shimamatsu, K, Inoue, O, Hashimoto, E, et al. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1996;23:1334-40.