

HAYDÉE MARINA DO VALLE PEREIRA

**Características de pacientes com hepatite C
crônica e transaminases normais**

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

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alci Barone

São Paulo

2005

“Se Deus é por nós, quem será contra nós?”
Romanos 8:31

Aos meus pais João e Abigail, bênçãos de Deus na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, a Ele toda honra, glória e louvor, para sempre.

Aos meus queridos pais *João* e *Abigail*, por serem exemplos na minha vida de fé, amor e perseverança.

A minha querida irmã Prof. Dra. *Jacira Helena*, que inúmeras vezes me orientou nessa dissertação, pelo amor, pela paciência.

Aos meus queridos vovó *Clarinda*, minha irmã *Raquel*, ao *Frankner*, meu cunhado, a *Luzia* e a pequenina *Jéssica*, presente de Deus para nós, que muitas vezes, com suas travessuras, alegrou meu coração e que mesmo distantes sempre torceram por mim.

Ao Prof. Dr. *Antonio Alci Barone*, pela confiança, pela humildade e orientação, minha gratidão.

À Dra. *Norma de Paula Cavalheiro*, pela competência, pela simpatia e pelo esforço para que esta pesquisa se realizasse.

À Dra. *Maria Cássia Jacintho Mendes Corrêa*, por ter me cedido seu ambulatório tão gentilmente para estudar esta população, pelas sugestões neste trabalho, obrigada.

Ao Dr. *Evandro Sobroza de Mello* pela simpatia, por me ajudar nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. *Roberto Focaccia*, por ter me feito apaixonar pelo estudo de hepatite C ao acompanhá-lo no ambulatório do Instituto de Infectologia Emílio Ribas.

À Prof. Dra. *Fátima Mitiko Tengan* pelas sugestões neste trabalho.

A FAPESP-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento de parte da pesquisa.

Aos residentes funcionários do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aos funcionários do LIM-47: *Carlos, Magali, Ana Carolina, Daniela, Biazon, Thelma, Clélia*.

Aos funcionários da biblioteca do Centro de Referência e Treinamento DST/AIDS: *Sônia, Cris, Ana, Patrícia e Regina* pelo levantamento dos artigos científicos, obrigada por tanta eficiência.

Aos meus amigos médicos do ambulatório do CRTA, a Dra. *Gabriela* e as meninas da recepção, que por várias vezes me ajudaram para que esta pesquisa se concluísse.

As minhas queridas amigas *Roseli* e *Rosemeire*, funcionárias da Pós-graduação, pela dedicação, eficiência e carinho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

SUMMARY

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA..... | 3 |
| 2.1. Hepatite C crônica - a pandemia..... | 3 |
| 2.2. Virologia..... | 4 |
| 2.2.1. Proteínas estruturais..... | 5 |
| 2.2.2. Proteínas não-estruturais..... | 5 |
| 2.3. Patogenia..... | 5 |
| 2.3.1. Resposta humoral..... | 5 |
| 2.3.2. Resposta celular..... | 6 |
| Resposta linfócito CD4+..... | 7 |
| Resposta linfócito CD8+..... | 7 |
| 2.3.3. Mecanismo citopático direto..... | 8 |
| 2.3.4. Mecanismo citocinas..... | 8 |
| 2.4. Aspectos clínicos e epidemiologia..... | 9 |
| 2.4.1. Manifestações extra-hepáticas..... | 14 |
| 2.4.2. Epidemiologia..... | 15 |
| 2.5. Vias de transmissão..... | 19 |
| 2.6. Métodos diagnósticos..... | 22 |

| | |
|---|----|
| 2.6.1. Detecção de anticorpos..... | 22 |
| 2.6.2. Método de RIBA-Immunobloting..... | 23 |
| 2.6.3. Detecção qualitativa do RNA do VHC..... | 24 |
| 2.6.4. Detecção quantitativa do RNA do VHC..... | 25 |
| 2.6.5. Sorotipagem..... | 25 |
| 2.6.6. Genotipagem..... | 25 |
| 2.6.7. Alanina aminotransferase (ALT)..... | 32 |
| 2.6.8. Diagnóstico anatomopatológico..... | 36 |
| 2.7. Tratamento..... | 49 |
| 3. JUSTIFICATIVA..... | 53 |
| 4. OBJETIVOS..... | 54 |
| 5. MÉTODOS..... | 55 |
| 5.1. Desenho do estudo..... | 55 |
| 5.2. Local do estudo..... | 55 |
| 5.3. População estudada..... | 55 |
| 5.3.1. Tamanho da amostra..... | 56 |
| 5.3.2. Definição de caso..... | 57 |
| 5.3.3. Critérios de inclusão..... | 57 |
| 5.3.4. Critérios de exclusão..... | 58 |
| 5.3.5. Coleta dos dados..... | 58 |
| 5.4. Aspectos éticos da pesquisa..... | 59 |
| 5.5. Exames laboratoriais utilizados..... | 59 |
| 6. ANÁLISE DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 74 |
| 7. RESULTADOS..... | 76 |
| 8. DISCUSSÃO..... | 85 |
| 9. CONCLUSÃO..... | 95 |
| 10. ANEXO..... | 96 |
| 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 97 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----|--|
| VHC | Vírus da Hepatite C Crônica |
| ALT | alanina aminotransferase |
| VHB | Vírus da Hepatite B Crônica |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida |
| CDC | Centers Diseases Control and Prevention |
| DST | Doenças Sexualmente Transmissíveis |
| IMC | Índice de Massa Corpórea |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Esquema do genoma do VHC apresentando as regiões não-codificadoras 5'NC e 3'NC; as estruturais, core, e do envelope E1, E2; e as não-estruturais NS2, NS3, NS4, NS5A e NS5B (Cavalheiro, 2004)..... | 4 |
| Figura 2 - Base para o ensaio de sorotipagem do VHC..... | 70 |
| Figura 3 - Resultados positivos de sorotipagem para tipos de 1 a 6 do VHC..... | 72 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Sistema Metavir para análise da fibrose e atividade inflamatória hepática..... | 41 |
| Tabela 2 - Classificação das Hepatites Virais Crônicas (Sociedade Brasileira de Patologia)..... | 42 |
| Tabela 3 - Ciclos de temperatura e tempo da Transcrição Reversa (RT) e PCR-VHC..... | 62 |
| Tabela 4 - Interpretação de resultados..... | 64 |
| Tabela 5 - Ciclos de temperatura e tempo da reação de seqüenciamento para Genotipagem..... | 66 |
| Tabela 6 - Ciclos de temperatura e tempo da reação de desnaturação... | 67 |
| Tabela 7- Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo gênero..... | 77 |
| Tabela 8- Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo faixa etária..... | 77 |
| Tabela 9 - Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo as características anatomopatológicas..... | 80 |
| Tabela 10 - Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo a atividade peri-portal e atividade estrutural..... | 81 |
| Tabela 11- Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo a atividade estrutural..... | 81 |
| Tabela 12 - Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo atividade periportal e a atividade estrutural..... | 82 |
| Tabela 13- Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo a esteatose..... | 83 |
| Tabela 14- Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo genotipagem..... | 84 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo a atividade periportal e a atividade estrutural..... | 83 |
|--|----|

RESUMO

Pereira HMV. *Características de pacientes com hepatite C crônica e transaminases normais*. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 119p.

Hepatite C tem evolução progressiva, persiste na maioria dos pacientes (85%) e leva a uma doença crônica assintomática. A maioria dos pacientes apresenta nível de ALT elevada e aproximadamente 25% normal. Estes geralmente são mulheres e não há associação entre genótipo e severidade da lesão hepática. Histologicamente apresentam lesão mínima e leve fibrose, embora cirrose tenha sido relatado. Visando estimar a prevalência, características demográficas, genótípicas e anatomopatológicas em pacientes com ALT normal, realizamos um estudo de série de 68 casos entre janeiro de 1997 a abril de 2000. A prevalência foi de 13,82%, 45,6% do gênero masculino e 54,4% feminino, média de idade 38 +/- 13 anos. Genótipo 1 em 84,75%, 2 em 6,78% e o 3 em 8,47%. Em 52,9% dos casos biópsia hepática revelou fígado reacional, porém uma importante proporção (29%) dos nossos pacientes com transaminases normais mostrou sinais de fibrose. Estes resultados sugerem a necessidade de revisar os algoritmos da prática de biópsia hepática nessa população. Descritores: 1. HEPATITE C CRÔNICA/patologia 2. HEPATITE C CRÔNICA/epidemiologia 3. ALANINA TRANSAMINASE/análise 4. GENÓTIPO 5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE/métodos 6. SEQUÊNCIA DE BASES.

SUMMARY

Pereira HMV. *Characteristics of patients with Chronic Hepatitis C and normal transaminase*. Dissertation (MSc). São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2005. 119p.

Hepatitis C evolves progressively persisting in the majority of patients (85%) resulting in an asymptomatic chronic disease. Most patients have high ALT levels and approximately 25% normal ALT. The latter are usually female and there is no association between genotype and severity hepatic lesion. Histology shows small lesion and low amount of fibrosis, despite cirrhosis having been reported. Aiming at assessing prevalence, demographic, genotypical and anatomopathological characteristics in patients with normal ALT levels, we studied a series of 68 cases between January 1997 and April 2000. There was a prevalence of 13,82%, 45,6% of which were male and 54,4% female, average age of 38+/-13 years. Genotype 1 in 84,75%, 2 in 6,78% and 3 in 8,47%. In 52,9% of the cases revealed liver reaction, however, an important proportion of patients showed histologic signs of fibrosis (29%). These results suggest the need to revisit the algorithm for liver biopsy practice. Key words: 1. hepatitis C, Chronic/pathology 2. hepatitis C, Chronic/epidemiology, 3. alanine transaminase/analysis, 4. genotype 5. Polymerase chain reaction/methods 6. base sequence.

1. INTRODUÇÃO

O primeiro reconhecimento da hepatite C ocorreu em 1975, quando foi demonstrado que a maioria dos casos de hepatite associada à transfusão não era causada pelos vírus A e B, razão pela qual essa hepatite foi então, denominada hepatite não-A, não-B.

Em 1989, a partir de técnicas de biologia molecular, clonaram e sequenciaram o genoma viral da hepatite não-A, não-B e ocorreu o primeiro relato do vírus C (1).

Com o desenvolvimento de meios diagnósticos baseados em detecção de anticorpos, foi então que o VHC foi descoberto como o maior causador da hepatite não-A, não-B.

Esta hepatite constitui-se uma doença com propensão a cronicidade em 85% dos indivíduos que entram em contato com o vírus, sendo que pode evoluir para cirrose, hepatocarcinoma, insuficiência hepática e morte.

Tornou-se uma das maiores causadoras de elevação de aminotransferases em indivíduos assintomáticos, sendo em 75% dos pacientes com hepatite C crônica os níveis de ALT são elevados, 20 a 30% dos pacientes os níveis de ALT são normais (2).

A dosagem sérica de aminotransferases tem sido amplamente utilizada como marcador de atividade de lesão hepática, porém a literatura tem contestado este achado, visto que estes pacientes com transaminases normais apresentam biópsia hepática com algum grau de lesão hepática,

embora na maioria, a lesão histológica é leve e a progressão para fibrose é menor que em pacientes com ALT elevada, contestando assim o paradigma de carreadores sadios do vírus (3).

Sendo assim, nessa pesquisa estudaremos este grupo de pacientes com hepatite C crônica e transaminases normais e elucidaremos a prevalência, genotipagem e aspectos anatomopatológicos e demográficos no nosso meio.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Hepatite C crônica - a pandemia

Embora novas infecções pelo vírus da hepatite C crônica tenham declinado durante a última década na maioria dos países desenvolvidos, a hepatite C crônica permanece como um problema de saúde pública.

Calcula-se que existam aproximadamente 200 milhões de pessoas infectadas cronicamente pelo VHC (4). A hepatite C, atualmente, é a principal causa de transplante hepático no mundo.

De acordo com estudos da Organização Mundial de Saúde, estima-se que 3% da população mundial esteja infectada pela hepatite C (5).

Embora a transmissão através de transfusão de sangue tenha sido praticamente eliminada após a introdução de testes mais sensíveis para detecção de anticorpos anti-VHC desde 1992, a infecção pelo vírus da hepatite C é a mais comum infecção crônica transmitida parentalmente nos Estados Unidos, mantém-se através do uso de drogas, que é responsável por proporção substancial de infecções por VHC atualmente, com taxas que variam de 70 a 90% (6).

Nos EUA, essa hepatite é responsável por 20% dos casos agudos de hepatites (7), 70% das hepatites crônicas e 40% das doenças hepáticas terminais, que causam de 8 a 10 mil mortes/ano, cujas projeções apontam para o triplo de infecções nos próximos 10 a 15 anos (8).

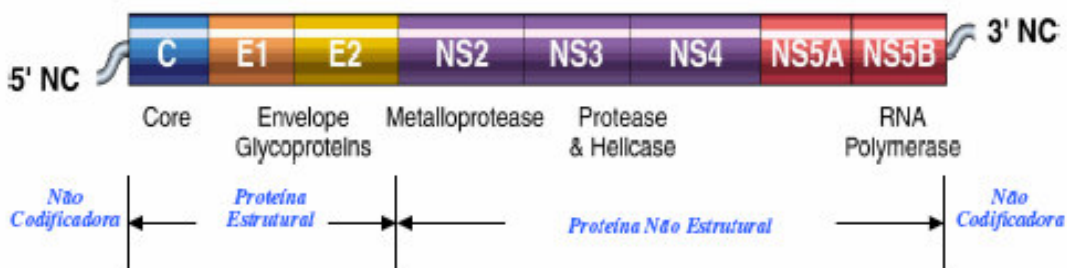
2.2. Virologia

O VHC é um membro da família *Flaviviridae*, que compreende três gêneros: o vírus da febre amarela, da dengue e da hepatite C.

O VHC é um vírus RNA simples, formado por cerca de 9.600 nucleotídeos. O genoma do VHC organiza-se numa fita simples de RNA, com polaridade positiva entre duas porções terminais 5', região altamente conservada, e 3', não-codificadoras, e, entre elas, uma única fase de leitura aberta (ORF, *open reading frame*), codificadora de uma poliproteína de 3000 aminoácidos que, depois de processada, origina produtos virais.

Nas regiões codificadoras, dividem-se as proteínas em estruturais - localizadas na porção aminoterminal, core e envelope (9) e não-estruturais - localizadas na porção carboxiterminal (NS2, NS3, NS4A, NS5A e NS5B).

Figura 1 - Esquema do genoma do VHC apresentando as regiões não-codificadoras 5'NC e 3'NC; as estruturais, core, e do envelope E1, E2; e as não-estruturais NS2, NS3, NS4, NS5A e NS5B (Cavalheiro, 2004)



2.2.1. Proteínas estruturais

Core ou nucleocapsídeo

Região altamente conservada, utilizada no diagnóstico e como *primers* para a técnica de sorotipagem do VHC (10) e responsável pela codificação de proteínas do capsídeo e do envelope.

Envelope

Composto por duas glicoproteínas E1 e E2. Na porção aminoterminal da glicoproteína E2 existem duas áreas com grande variação de aminoácidos chamadas regiões hipervariáveis 1 e 2, importantes para o desenvolvimento de quasispécies.

2.2.2. Proteínas não-estruturais

São seis as proteínas envolvidas no processo de replicação viral: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, das quais a NS3 tem ação fundamental na clivagem das demais proteínas não-estruturais e a NS5 tem função pouco conhecida, cujo sítio, no entanto, pode oferecer sensibilidade ao Interferon.

2.3. Patogenia

2.3.1. Resposta humoral

O papel da resposta humoral na infecção pelo VHC é sugerido pela presença de agregados linfóides que contêm células B ativadas, níveis

elevados de células B, que ativam IL4, e resposta mediada por células B com produção de anticorpos a muitos polipeptídeos estruturais e não-estruturais (11).

Entretanto, no controle da infecção e na patogênese da doença hepática, o papel da resposta humoral é ainda desconhecido. Sabe-se que, no entanto, a produção de anticorpos (AC) contra o VHC é a base do diagnóstico da doença, AC esses cujas funções são: a neutralização do vírus e a atividade citotóxica anticorpo-dependente.

Em mais de 90% dos pacientes, os AC são formados contra o envelope do VHC, proteínas E1 e E2, cuja ação, embora neutralizante, não é suficiente para eliminar o vírus.

Um provável mecanismo para esse fato é a evolução do vírus, as quasispécies, que deixam de possuir epítomos reconhecíveis, fato que em nada supreeende, uma vez que há um grande número de mutações no envelope das regiões hipervariáveis em E1 e E2.

Além disso, a atividade neutralizadora é ineficiente para evitar re-infecções (12). A resposta humoral aparentemente não é importante na lesão hepática, porém, é responsável pelas lesões extrahepáticas (13).

2.3.2. Resposta celular

A resposta celular compreende etapas específicas - atividade de células NK e liberação de INF - em fases iniciais, quando erradica algumas infecções e mecanismos antígeno-específicos - linfócitos T citotóxicos e

citocinas inflamatórias. Essa resposta é mais importante que a inespecífica, na eventual erradicação viral.

Resposta linfócito CD4+

Trata-se de um tipo de resposta fundamental, porque é precoce, que estimula a síntese de anticorpos pelas células B e estimula os linfócitos TCD8+, mesmo os que destroem células infectadas. Uma resposta CD4 vigorosa controla precocemente a infecção e protege contra o dano hepatocelular subsequente.

Resposta linfócito CD8+

Vem sendo demonstrado que os linfócitos CD8+ são importantes no controle das infecções virais e em patogênese da injúria celular *in vivo*. As evidências do papel do linfócito CD8+ provêm de estudos que demonstram que:

a) a maioria das células ativadas no fígado de pacientes infectados são linfócitos TCD8+;

b) há uma regulação para cima da expressão de moléculas de adesão - recrutadoras de células T;

c) grande parte dos pacientes com infecção crônica pelo VHC têm linfócitos TCD8+ isolados no sangue periférico e no fígado (11).

Os mecanismos explicativos para os efeitos dos linfócitos citotóxicos permanecem especulativos. A produção local de citocinas, como, por exemplo, TNF alfa e INF gama pode reduzir a replicação viral.

O mecanismo de morte do hepatócito mais importante induzido pelo linfócito T citotóxico é a apoptose (11).

O linfócito TCD8⁺ é importante no controle da infecção pelo VHC, às custas de lesão imunemediada.

2.3.3. Mecanismo citopático direto

Múltiplos fatores podem influenciar a interação vírus/hospedeiro em pacientes infectados pelo VHC. O que contraria esse efeito em indivíduos imunocompetentes é a existência de portadores sãos, com ALT persistentemente normal, apesar da presença do RNA viral no sangue (3). Existem, porém, algumas evidências de sua ação citopática:

- a) outros membros da família *Flaviviridae* são citopáticos;
- b) as células necróticas não apresentam infiltrado inflamatório ao seu redor;
- c) com o tratamento ocorre redução relativamente paralela da ALT à redução da viremia;
- d) alguns estudos correlacionam viremia e dano hepatocelular, principalmente em imunossuprimidos;
- e) desaparecimento da esteatose hepática nos pacientes com genótipo 3, após tratamento com resposta virológica sustentada.

2.3.4. Mecanismo citocinas

A elevada taxa de replicação viral e o grande número de hepatócitos infectados excedem a capacidade de ação dos linfócitos T citotóxicos. Por

isso, as citocinas são aliadas importantes na tentativa de controle da infecção (11).

A estimulação com peptídeos do VHC de clones de células derivadas do fígado ou da periferia do hospedeiro resulta na síntese de citocinas do tipo Th1- $\text{INF}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$. Além disso, o nível de $\text{INF}\gamma$ e IL2 se correlaciona com o grau de fibrose e inflamação portal. Outros pesquisadores encontram um perfil tipo Th2-elevação de IL4 e IL-10 no soro de pacientes infectados (11).

2.4. Aspectos clínicos e epidemiologia

Infecção pelo VHC é infreqüentemente diagnosticado durante a fase aguda da infecção. Pode ocorrer manifestação clínica, geralmente no período de sete a oito semanas. Apenas um terço dos indivíduos apresenta sintomas de hepatite aguda com icterícia, mal-estar e náuseas; a grande maioria, por sua vez, apresenta sintomas inespecíficos, como astenia, dor em quadrante superior direito. A maioria deles também tem aumento dos níveis de aminotransferases que, tipicamente, flutuam entre 1,5 a 10 vezes acima do limite superior; em 1/3 dos pacientes esses níveis podem ser normais (14).

Uma vez que o curso fulminante é extremamente raro, na ausência de co-infecções com outros vírus hepatotrópicos (15), recomenda-se a vacinação contra hepatite A para esses pacientes bem como para outros pacientes com doença hepática crônica.

Lamentavelmente, a hepatite autolimitada não é o curso da infecção pelo VHC. A maior característica da hepatite C é a propensão a cronicidade,

cujos mecanismos, acredita-se, além da presença das quasispécies, manifesta grande capacidade mutagênica, o que propicia seu constante escape à intensa resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro.

A infecção crônica pelo VHC evolui lentamente e costuma ter um curso clínico variado e heterogêneo, que vai da cura espontânea a uma forma assintomática com enzimas séricas normais ou elevadas até cirrose, insuficiência hepática e hepatocarcinoma.

A taxa de evolução para cronicidade pode ser afetada pela rota, tamanho e tipo do inóculo bem como pela idade e estado de imunocompetência do hospedeiro. Alguns desses fatores foram constatados em pacientes com hepatite crônica pós-transfusional - sangue ou imunoglobulina (16) - em estudo de coorte realizado entre 135 pacientes.

Deles, 31 resolveram completamente a infecção em 12 meses; 104 (77%) evoluíram para a cronicidade; 21 (32%), dentre os 65 restantes, desenvolveu cirrose; e 1 progrediu para hepatocarcinoma.

Outro estudo, no período de 1977 e 1978, considerou uma casuística entre 62.667 mulheres irlandesas, que receberam imunoglobulina Rh contaminada.

Em 704 delas, o anti-VHC foi positivo e, em 309 (55%), foi detectado o RNA VHC. Durante 17 anos, 376 das pacientes (96%) tiveram um *follow-up*. Delas todas, eram sintomáticas 81% das pacientes, 66% dos quais apresentavam fadiga; 47%, discreta elevação de ALT; e 8%, ALT superior a 100U/L.

Em 98% dos casos realizou-se biópsia hepática, que revelou atividade inflamatória discreta em 41% deles; moderada, em 52%; grave, em 4%; e cirrose, em 2% (17). É possível que o tamanho do inóculo nos pacientes submetidos à transfusão de imunoglobulina tenha interferido de forma favorável, se comparado ao tamanho do inóculo nos demais pacientes submetidos à transfusão. Do mesmo modo, o gênero feminino também exerceu influências positivas na evolução natural da doença.

Após infecção aguda, entre 70% e 90% dos pacientes desenvolvem infecção crônica (5), que geralmente é assintomática, sendo *clearance* espontâneo um evento raro (15 a 25%). Nesse caso, a maioria dos pacientes evolui com persistência ou flutuação de ALT (60% a 70%), e 25% dos cronicamente infectados, apresentam níveis normais de ALT (2).

Geralmente, pacientes com hepatite C crônica são assintomáticos (18) e descobrem acidentalmente a doença após doação de sangue ou exames de *check-up*; mesmo os pacientes com ALT normal não apresentam sintomatologia diferente dos com ALT alterada. Entretanto, em razão do caráter silencioso da hepatite C, o CDC recomenda que pacientes devem ser investigados para existência de hepatite C, caso possuam fatores de risco associados à transmissão, tais como, transfusão de sangue ou plasma antes de 1990; transplante de órgão(s) antes de julho de 1992; uso de drogas endovenosas; exposição percutânea de profissionais da saúde (19).

Para avaliar características clínicas em 275 pacientes com infecção crônica pelo VHC, participaram de um estudo de caso-controle 75 pacientes, com ALT persistentemente normal, e 200, com ALT elevada. Não houve

diferenças significativas de sintomas, tais como: fadiga, fraqueza, bem como de co-morbididades como: diabetes mellitus, artrite reumatóide e falência renal crônica. Os autores encontraram uma tendência de depressão no grupo de pacientes com ALT elevada, embora estatisticamente não-significativa (20).

Há uma clara concordância na literatura que demonstra prevalência do gênero feminino (21, 22, 23) nos pacientes com ALT normal. Alguns autores sugerem que essa prevalência se deve a um efeito protetor hormonal (24).

O diagnóstico da doença pode ser feito quando ela está em estágio avançado, com o fígado já com cirrose. Em pacientes com ALT normal, no entanto, o curso da doença é muito benigno e a progressão da fibrose é mais lenta. Mathurim et al. (25) demonstraram isso em estudo com pacientes cuja taxa de progressão de fibrose com ALT é persistentemente normal e os compararam com pacientes cujos níveis de ALT são elevados.

Esses investigadores concluíram que menores valores de ALT estão relacionados com menor escore de atividade histológica bem como, em virtude de a fibrose ser considerada uma consequência da extensão e de repetições da atividade necro-inflamatória, verificaram que a taxa de progressão de fibrose é menor nos pacientes com ALT normal, fibrose severa foi associada ao alto consumo de álcool.

Poynard et al. (26) também estudaram a taxa de progressão da fibrose no fígado mediante análise de largas séries de pacientes não-tratados, com data da contaminação definida e média anual da taxa de

progressão de fibrose no fígado calculada por intermédio de uma única espécime de biópsia hepática.

Esse procedimento chegou a desenvolver um modelo que sugere um amplo espectro de progressão e classifica os pacientes em três terços: pacientes rápidos progressores - tempo de infecção inferior a 20 anos; progressores intermediários - cirrose com 20 a 50 anos; e pacientes lentos ou não-progressores - tempo de cirrose superior a 50 anos.

O mesmo trabalho também identificou como fatores de risco associados à progressão de fibrose:

a) tempo de infecção superior a 40 anos, fato provavelmente devido a mecanismos de defesa contra VHC, que é mais fraco em pessoas mais velhas;

b) mais que 50g de consumo de álcool diário foi associado ao aumento da taxa de progressão para fibrose;

c) gênero masculino associado a fibrose, independentemente do tempo de infecção e do consumo de álcool.

A literatura demonstra que pacientes com ALT normal podem representar uma população de pacientes relativamente lentos progressores (20, 24, 25, 27). Analisada a taxa de progressão de fibrose em pacientes com ALT normal comparada à de pacientes com ALT elevada, a taxa de progressão de fibrose/ano foi definida como a razão estágio de fibrose, classificada pelo Metavir/duração da infecção. A média de progressão para fibrose encontrada em pacientes com nível de ALT normal foi de 0,05 (95% CI:0.040-0.070), o que sugere uma taxa muito baixa de progressão de

fibrose, em contraste com o observado em pacientes com ALT elevada, que correspondeu a 0.130 (95% CI:0.100-0.160). Com essa estimativa, o tempo médio de progressão para cirrose nos pacientes com ALT normal seja de oitenta anos.

Uma vez estabelecida a cirrose, o risco de carcinoma hepatocelular é de aproximadamente 1% a 4%/ano.

Carcinoma hepatocelular pode ocorrer sem cirrose, mas é raro.

2.4.1. Manifestações extra-hepáticas

As manifestações extra-hepáticas são variadas, quer por sua ação direta, quer por indução de fenômenos auto-imunes, que muitas vezes decorrem da reação entre antígenos virais e anticorpos produzidos pelo hospedeiro, fatores que levam à formação de imunocomplexos e sua precipitação, com ativação de mecanismos responsáveis pela expressão clínica.

As manifestações mais comuns e reconhecidas são: a crioglobulinemia mista, glomerulonefrite e porfiria cutânea tarda.

A crioglobulinemia, primeira manifestação extra-hepática reconhecida, é caracterizada pela deposição de imunocomplexos circulantes em vasos sangüíneos de pequeno e médio calibre. As crioglobulinas são detectadas em mais de 1/3 dos pacientes com hepatite C crônica, mas a síndrome clássica de crioglobulinemia ocorre em somente 1% a 2% desses pacientes (14).

As manifestações clínicas comuns variam da vasculite leve, com púrpura característica, artralgias e astenia, a vasculite grave, com envolvimento renal e do sistema nervoso.

Estudo de caso-controle, de base hospitalar, realizado durante 1992 e 1999 avaliou 34.204 casos pareados com 136.816 controles. Encontrou-se associação estatisticamente significativa entre VHC e porfiria cutânea tarda, vitiligo, crioglobulinemia, glomerulonefrite membranoproliferativa e linfoma não-Hodgkin. Não houve prevalência significativa de tireoidite, síndrome de Sjögren e linfoma Hodgkin (28).

2.4.2. Epidemiologia

De acordo com o NHANES, National Health and Nutrition Examination Survey, num estudo de base populacional, no período de 1988 a 1994, verificou-se que a prevalência na população geral é de 1,8%, a qual, nos EUA, correspondia a 3,9 milhões de infectados pelo VHC (5), notadamente entre usuários de drogas ilícitas - cocaína e maconha. Visto que três em cada quatro pacientes soropositivos também são portadores de viremia, estima-se que 2,7 milhões de pessoas nos Estados Unidos estejam com infecção ativa pelo VHC.

Estima-se também que a maior prevalência de infecções relatadas ocorra no Egito, com taxas que variam de 15% a 20%, em razão do uso de terapia parenteral antiesquistossomal, com insuficientes técnicas de esterilização de equipamentos utilizados (29).

Na população geral do município de São Paulo, por sua vez, a soroprevalência de anticorpos anti-VHC é de 1,42%, o que, de acordo com estimativa dos autores, corresponde a 136 mil pessoas infectadas na cidade, das quais a maioria é de adultos com 30 anos ou mais e cuja prevalência atinge o pico de 3,80% no grupo etário de 50 a 59 anos (30).

Quanto à prevalência da hepatite C crônica e da ALT normal, nos EUA, estima-se que 25% dos pacientes com infecção crônica pelo VHC tenha níveis de ALT persistentemente normais (31).

Com a finalidade de avaliar a história natural de pacientes com anti-VHC reagente com ALT persistentemente normal, durante sete anos de seguimento, foi realizado estudo prospectivo entre janeiro de 1990 e janeiro de 1992, cujos critérios de inclusão foram:

- a) três dosagens de ALT persistentemente normais, em pelo menos três ocasiões, no último ano;
- b) ausência de sintomas e/ou sinais de doença hepática crônica;
- c) exames físico e sangüíneo a intervalos programados e procedimentos invasivos, se necessários, com consentimento do paciente.

Encontrou-se nessa casuística a prevalência de 10,7% (21 dos 195 pacientes) no primeiro ano de seguimento e 9,2% (6 dos 175 pacientes) no segundo ano (27).

Em hepatite C crônica com ALT persistentemente normal, a taxa de progressão de fibrose era desconhecida, até que um grupo de pesquisadores franceses realizou um estudo com 1.353 pacientes, entre janeiro de 1992 e dezembro de 1996. Foram encontrados 102 pacientes com

ALT repetidamente normal, definido como LSN de ALT 45U/L, mensurado pelo menos três vezes durante os seis meses prévios. Obtiveram 7,5% de prevalência nessa população e mostrou-se que em pacientes com VHC e ALT normal a taxa de progressão de fibrose é duas vezes menor que em pacientes com VHC e ALT elevadas (25).

Para muitas pessoas infectadas com VHC, a rota de infecção, o risco de transmissão e a severidade da doença hepática são desconhecidos. Conry-Cantilena estudou essas variáveis em doadores de sangue, o que revelou que de um total de 481 doadores de sangue, 248 foram VHC reagentes pelo RIBA; 102 indeterminados e 131 VHC não-reagentes.

Mediante modelos de regressão logística, foram encontrados quatro fatores de risco para infecção pelo VHC: história de transfusão de sangue em 66 pacientes, 27% $p < 0,001$; uso de droga endovenosa em 103, 42% $p = 0,001$; promiscuidade sexual em 132, 53% $p = 0,002$; e uso de *piercing* em homens $p < 0,05$.

Na avaliação inicial, com evidência bioquímica de doença hepática, foi encontrada VHC reagente pelo RIBA em 138 dos 248 participantes (56%). Depois de o período de seguimento ter sido incluído na análise, a porcentagem de participantes com pelo menos uma mensuração de ALT elevada aumentou para 69%. Durante o seguimento, a maioria dos participantes tinha níveis de ALT normais (42%) ou pico de ALT não superior a duas vezes o LSN (42%).

Concluíram que a maioria dos participantes positivos para VHC pelo RIBA tinham fatores de risco à exposição parenteral, evidência bioquímica de hepatite crônica e RNA VHC detectável (32).

Pacientes com ALT persistentemente normal são definidos hoje como portadores de anti-VHC e RNA VHC, detectado por PCR e com nível de ALT normal, documentado por repetição de testes, pelo menos em três ocasiões consecutivas, num período de seis meses. Estima-se que, com o uso desse conceito, 25% dos pacientes com infecção crônica pelo VHC tenham níveis de ALT persistentemente normais (2).

Em estudo transversal de base populacional, cujo objetivo era determinar a prevalência e a severidade da infecção pelo VHC, foram recrutadas 4.280 pessoas assintomáticas, população essa constituída por trabalhadores de uma empresa e de seus parentes, que estavam sendo submetidos a um programa para identificar fatores de risco cardiovascular.

Os autores do estudo encontraram 116 pessoas [2,4% (95% IC 1,97% a 2,84%)] anti-VHC reagentes, das quais 85 [1,76% (IC 1,39% a 2,14%)] tinham RNA-VHC detectável. Durante 12 meses de seguimento, 39 pacientes apresentaram ALT normal (46%), o que foi definido como ALT<50U/L em zero, 1, 3, 6 e 12 meses. Encontraram significantes alterações histológicas em 19% (IC 7,2% a 36,4%) dos pacientes com ALT normal e 61% (IC 45,4% a 74,9%) com ALT elevada.

Constataram que a prevalência da infecção pelo VHC aumentou com a idade - 0,67% (IC 0,23% a 1,57%) em pessoas de 16 a 30 anos; 1,4% (IC 0,93 a 2,08%) nas de 31 a 45 anos; e 2,4% (IC 1,8% a 3,2%) nas de 46 a 60

anos ($p=0,003$). Mas, a porcentagem de pessoas com ALT persistentemente normal foi similar nos três grupos. Constatou-se que a severidade da doença aumentou com a idade, correlacionada com ALT elevada (33).

Seis centros europeus encontraram em 864 pacientes com hepatite C crônica, 66 (8%) deles com níveis de ALT persistentemente normal, cujo critério foi um valor menor que o limite superior da normalidade, obtido em duas a quatro dosagens, durante um período de seis meses (34).

Em estudo realizado em Salvador, BA, no período de dezembro de 1994 a março de 1998, com 232 pacientes com VHC, foram encontrados 41 (17,6%) que apresentavam níveis de ALT persistentemente normais, e 192 (82,4%) com alterações de ALT ou flutuação (35).

2.5. Vias de transmissão

Exposição sexual

O potencial de transmissão sexual do VHC é obviamente menor que o do VHB, bem como de outros vírus hepatotrópicos e do HIV.

Análise de transmissão sexual de hepatite C entre 24 casais heterossexuais encontrou 22 deles que apresentavam o mesmo subtipo viral e altas porcentagens de homologia (região NS5b) entre 93% e 99,4%.

Os subtipos do VHC encontrados foram 2 (9,1%) casais infectados por 1a; 9 (40,9%), pelo subtipo 1b; 1 (4,6%), pelo subtipo 2b; e 10 (45,5%), pelo subtipo 3a.

Os dois casais discordantes foram infectados pelos subtipos 2b e 1b, e 1b e 1a, respectivamente. Com base nos questionários aplicados, os fatores de risco encontrados foram: 9 (37,5%) por transfusão de sangue; 17 (70,8%) por uso de drogas endovenosas; 15 (62,5%) por acupuntura; e 5 (20,8%) por tatuagem.

O compartilhamento de utensílios de higiene pessoal relatado pelos casais apresentou altos índices. Dentre eles, 6 (25%) assumiram o uso de escova de dentes; 16 (66,7%), lâmina de barbear; 21 (87,5%), cortador de unhas; e 14 (58,3%), alicate de manicuro.

Apesar de a alta similaridade genômica do VHC dar provável suporte à transmissão entre esses casais, o uso comum de utensílios de higiene pessoal dificultou a interpretação dos dados em relação à transmissão sexual do VHC (36).

Existem evidências de que a via sexual é fator de risco entre os portadores de DST, entre pessoas sexualmente promíscuas e não-usuárias de preservativos, em relações com trauma.

Pode ocorrer transmissão sexual do VHC, mas, por essa via, o vírus é ineficientemente disseminado (19,37).

Transfusão de sangue

Os fatores de risco mais associados à infecção pelo VHC são o uso de drogas endovenosas e a transfusão de sangue.

Até recentemente, em países desenvolvidos, a transfusão de sangue era o maior fator de risco para infecção pelo VHC. A partir de 1990, 1992,

com a introdução de medidas de triagem do sangue de doadores para detecção de anticorpos anti-VHC, reduziu-se dramaticamente o risco de infecção pelo VHC associado à transfusão (37).

Exposição ocupacional

Profissionais da saúde que entram em contato com sangue e/ou hemocompetentes apresentam um risco aumentado de infecção pelo VHC. A estimativa de risco de transmissão por acidentes com agulha é de 30%, pelo VHB; 3%, pelo VHC e 0,3%, pelo HIV. Esses números são influenciados pelo tamanho do unóculo, tamanho da agulha e profundidade da inoculação (37).

Uso de drogas

Embora o número de casos de hepatite C aguda entre usuários de drogas tenha declinado desde 1989, tanto a incidência quanto a prevalência do VHC permanecem altas nesse grupo (19).

A infecção pelo VHC é adquirida mais rapidamente, logo após o início de uso de drogas, que outras infecções virais (VHB, HIV), e a taxa de infecção pelo VHC, entre usuários de drogas, é quatro vezes maior que a taxa de infecção pelo HIV. Após 5 anos de uso 90% dos usuários são infectados com VHC (19).

O uso de cocaína intranasal parece raramente contribuir para a transmissão, estudos do CDC indicam que uso de cocaína intranasal na ausência de drogas endovenosas é incomum.

Transmissão perinatal

Transmissão materno fetal ocorre, mas é infreqüente, em torno de 6%. Entretanto a co-infecção com HIV aumenta o risco de transmissão (37).

2.6. Métodos diagnósticos

Baseados no conhecimento da estrutura viral foram desenvolvidos vários métodos diagnósticos, que podem ser divididos em:

- detecção de anticorpos contra proteínas do vírus - sorologia;
- detecção viral pesquisa de antígenos.

2.6.1. Detecção de anticorpos

Foram desenvolvidos três exames consecutivos, que sofreram progressão na sensibilidade.

Ensaio imunoenzimático

São os testes mais usados, como o *screening* para infecção do VHC, cuja reação é simples bem como é barato. Eles detectam anticorpos contra antígenos do VHC, mas não distinguem infecção aguda de infecção crônica.

Elisa de primeira geração

Esse teste baseia-se na detecção de anticorpos contra a região NS4 C100-3. No entanto, o uso isolado desse teste resulta em baixa sensibilidade e especificidade.

Elisa de segunda geração

Esse teste contém antígenos do core C22-3, C200 (C100/C33) e NS3, além do C100-3, também presente no Elisa de primeira geração.

O uso do Elisa de segunda geração diminuiu o período de janela do VHC de 4 para 10 semanas em relação ao Elisa de primeira geração (38).

Elisa de terceira geração

Além de antígenos já presentes no Elisa de segunda geração, esse teste inclui antígenos NS5.

Atualmente, os testes utilizados são de segunda e terceira geração. O Center Disease Control and Prevention recomenda que todo ensaio imunoenzimático positivo deve ser ratificado pelos seguintes testes confirmatórios (19).

2.6.2. Método de RIBA-Immunoblotting

A utilização do testes imunoenzimáticos em população de baixo risco (doadores de banco de sangue, população em geral) e em pacientes imunocomprometidos demonstra ocorrência de resultados falso-positivos, razão pela qual foram desenvolvidos os testes confirmatórios com o intuito de melhor discriminar resultados positivos nessa população.

Esse teste é baseado na detecção de anticorpos contra antígenos específicos aderidos a uma fita de nitrocelulose. É considerado positivo o resultado cuja amostra apresenta reatividade contra dois ou mais antígenos,

um dos quais é o capsídeo ou NS3. Na grande maioria dos casos, um teste com resultado positivo significa infecção em curso.

No resultado negativo, o soro testado não apresenta reatividade.

No resultado indeterminado, ocorre reatividade contra apenas um antígeno. Pode ocorrer no caso de pessoas recentemente infectadas, no período de soroconversão, e, ocasionalmente, no caso de pessoas cronicamente infectadas pelo VHC.

Também pode tratar-se de resultado de teste imunoenzimático falso-positivo, interpretação, aliás, mais comum desse teste em populações de baixo risco para infecção pelo VHC.

Recomenda-se repetir o teste em período maior que um mês ou realizar detecção RNA viral (39).

O teste de RIBA tem recebido indicação restrita, visto que, após resultado de testes imunoenzimáticos positivos, vem-se realizando a pesquisa do VHC-RNA, em razão do alto custo desses testes.

2.6.3. Detecção qualitativa do RNA do VHC

O diagnóstico da infecção pode ser feito por detecção qualitativa do RNA viral mediante técnicas de amplificação do código genético do VHC.

Para detecção do RNA viral, pode-se utilizar a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e TMA.

O resultado desse teste pode ser comprometido em falso-negativo, em razão da característica do vírus C, que tem períodos de flutuação, o que leva à conclusão de que um único teste negativo apenas, não exclui a

ocorrência de infecção. Recomenda-se, portanto, a repetição do teste em múltiplas ocasiões (39).

2.6.4. Detecção quantitativa do RNA do VHC

Esse teste é menos sensível que a determinação do RNA do VHC, razão pela qual não deve ser usado como primeiro teste para confirmar ou excluir diagnóstico da infecção pelo VHC (19). Mais usado na avaliação de resposta ao tratamento, é um teste que se baseia na amplificação do número de partículas ou do sinal.

2.6.5. Sorotipagem

Esse método identifica os tipos virais do VHC por meio de métodos sorológicos de identificação de AC específicos contra as regiões NS4 e core do VHC. Sua maior vantagem é a habilidade de se processar grande número de amostras num único dia de trabalho bem como a facilidade de se dispensarem procedimentos que compreendem biologia molecular (10). Sua desvantagem incide na baixa sensibilidade em imunodeprimidos e em discriminar apenas os seis tipos do VHC, não seus subtipos.

2.6.6. Genotipagem

Todos os vírus, em especial os vírus RNA, podem alterar seu genoma durante o processo de replicação estreitamente aparentados com o vírus nativo, mas diferentes deles, que podem ser considerados novos variantes.

Dessa forma, uma população de vírus RNA possui uma quasispécie, ou seja, um conjunto de moléculas muito semelhantes, que guardam muitas características gerais em comum, mas, por outro lado, uma população heterogênea, em razão das diferenças na seqüência nucleotídica. Esse fato observado com freqüência em pessoas infectadas pelo vírus da hepatite C, que ocasiona algumas diferenças encontradas na evolução da doença, como a persistência e a resposta ao tratamento (40).

De acordo com o grau dessa variação, essa grande heterogeneidade viral caracteriza os tipos do vírus C. Baseados na comparação das seqüências da região altamente conservadora do VHC, a região NS5 do genoma viral, em diferentes partes do mundo, estabeleceu-se que:

- Genótipos - até 30% de variação na seqüência de nucleotídeos;
- Subtipos - 20% a 25% de variação na seqüência de nucleotídeos;
- Isolados - 5% a 10% de variação na seqüência de nucleotídeos;
- Quasispécies - < 2% de variação na seqüência de nucleotídeos.

Em 1994 (41) foram padronizadas as várias nomenclaturas descritas num único sistema de classificação dos genótipos do VHC, limitando até o momento a seis genótipos e a pelo menos 80 subtipos (42).

De acordo com esse sistema, o VHC é classificado com base na similaridade da seqüência de nucleotídeos, dentro de grupos genéticos maiores designados genótipos.

Os tipos do VHC devem ser identificados por números arábicos e os subtipos, por letras minúsculas do alfabeto, ambos por ordem de descoberta, seis genótipos (1, 2, 3, 4, 5, e 6), apresentando subtipos (a, b, c...). Novas

variantes, que foram citadas no Vietnã, Tailândia, Burma e Indonésia, foram originalmente classificadas como genótipos 7, 8, 9, 10 e 11. Porém, análises complementares sugeriram que 7, 8, 9 e 11 deveriam ser classificados como subtipos do genótipo 6a, e o grupo 10, como subtipo do genótipo 3a.

Esses seis tipos, com pelo menos 80 subtipos, têm mostrado ter diferente distribuição geográfica.

A diversidade genotípica implica em muitos aspectos da doença: na epidemiologia, porque apresenta distribuição geográfica variável e também porque a sua determinação se faz necessária para o estudo das vias de contágio, na patogenia porque condiciona cepas com diferentes graus de virulência, podendo ocorrer co-infecção com diferentes genótipos, no tratamento porque diferentes genótipos apresentam diferentes respostas às drogas.

Genótipo 1, 2 e 3 são os mais freqüentemente tipos virais encontrados no mundo (43). Diferenças significativas, entretanto, são encontradas, desde que examinada a distribuição do subtipo.

O tipo 1a é mais freqüentemente encontrado na Europa do Norte e na América do Norte (44), ao passo que o subtipo 1b, 2a e 2b é mais comum no Japão e na Europa Ocidental.

O tipo 3 é mais prevalente na Índia, Bangladesh e outras partes da Ásia, sendo que 3a é particularmente prevalente em usuários de drogas endovenosas na Europa e nos Estados Unidos (45).

A distribuição geográfica dos outros tipos mais raros também tem sido bem caracterizada. O tipo 4 é o principal genótipo encontrado no Oriente

Médio, Egito e América Central; o tipo 5 é quase exclusivo da África do Sul; e o tipo 6, em Hong Kong, Macau e Vietnã.

No Brasil (10) foi encontrado, em doadores de sangue em São Paulo, predomínio de 70% do sorotipo 1, 22,3% do sorotipo 3 e 4,2% do sorotipo 2.

Estudos conduzidos em 130 pacientes brasileiros com VHC, de 1994 a 1997, verificaram dados semelhantes, com o objetivo de avaliar a significância clínica dos genótipos e a influência deles na resposta ao Interferon: 80 pacientes com tipo 1, dos quais 33,8% tinham genótipo 1b, 7 pacientes com genótipo 2 e 43 pacientes com genótipo 3 (46).

Análises de 7,5 mil amostras provenientes de bancos de sangue da região Nordeste (Rio Grande do Norte), Sudeste (Rio de Janeiro) e Centro-oeste (Goiás) apresentam algumas variações na distribuição geográfica dos subtipos do VHC. Na região Nordeste são mais comumente encontrados os subtipos 1b e 3a, ao passo que, no Centro-oeste, o subtipo 1a foi predominante. Na região Sudeste, os subtipos 1b e 1a foram mais freqüentes.

Os autores do estudo concluíram que o genótipo 1 prevalece nas três regiões do Brasil, do qual o subtipo 1a foi encontrado em 34,3% dos exames e o 1b, em 30,0%; o 3a correspondeu a 25,7% dos isolados, ao passo que o 2b é raro e 2a não foi detectado (47).

Resultado semelhante foi encontrado em estudo feito num centro de referência em Salvador, BA, com predomínio do genótipo 1 em 63% das amostras (24,1% infectados pelo genótipo 1a e 38,6% pelo 1b), 26% para o genótipo 3a, 6% para o 2a, 2,5% infectados por mais de um genótipo e

2,5%, por genótipo indeterminado (48). Em contraste com os resultados apresentados pelos estudos europeus (49), nessa população, o genótipo 3 não parece estar relacionado ao uso de drogas endovenosas.

Outro estudo realizado em Salvador (35) encontrou predomínio semelhante dos genótipos. De acordo com hipótese dos autores, haveria predomínio dos genótipos 4 e 5, prevalentes na África, visto que 80% da população de Salvador é originária da África. No entanto, o estudo demonstrou que a introdução do VHC naquela região foi provavelmente relacionada à imigração européia.

Na região Sul do Brasil prevalecem os genótipos das demais regiões brasileiras, predominam o subtipo 1, em 55% das amostras, seguido pelo subtipo 3, em 37% e o subtipo 2, em 8%. Em contraste com outros estudos da mesma região, esse estudo verificou uma alta prevalência de genótipo 3 (50).

Recentemente, a ocorrência dos genótipos 4 e 5 também foram descritos no Brasil (51, 52).

Estudos referentes à prevalência de genótipos e níveis de ALT normal também mostram uma diversidade na distribuição.

Em análise da distribuição de genótipo em dois grupos de pacientes, com ALT elevada e ALT normal, verificou-se que a maioria dos 46 pacientes com ALT normal foi infectada pelo tipo 2a (43%), seguido pelo genótipo 1b (17%), pelo 1a (17%) e pelo 3 (13%); 4 pacientes (9%) mostraram uma mistura de genótipos (18).

Estudo de uma coorte de 691 pacientes com aminotranferases normais em quatro centros italianos reforça a prevalência do genótipo 2 na maioria dos pacientes (52%), ao passo que 28%, do genótipo 1b, 14%, do genótipo 1a e 6%, dos outros subtipos (22).

Dados de Rossini A. et al, na Itália, constataram que o subtipo 2c está amplamente distribuído e é responsável pela infecção em indivíduos com hepatite C com ALT normal (53).

Estudo de uma população de doadores com ALT normal e ALT elevada verificou que o genótipo 2a foi o mais freqüente em pacientes com ALT normal, o que sugere a existência de diferentes subtipos do genótipo 2 naquela população, a italiana (54).

Avaliação de 37 pacientes durante cinco anos encontrou em 56% deles o genótipo 2a, em 41% dos pacientes predomínio do genótipo 1b e em 3%, do genótipo 1a (27).

Morisco et al. observaram pacientes com nível sérico de ALT em série normal, com prevalência do genótipo 2a seguido do 1b (55).

Em contraste com esses estudos, a avaliação da distribuição dos genótipos numa coorte francesa de 1.620 pacientes com hepatite C crônica, estudou-se uma amostra de 36 pacientes com ALT persistentemente normal, dos quais 57% eram infectados pelo genótipo 1, 26%, pelo genótipo 2 e 17%, pelo genótipo 3 (56).

Outro estudo de pacientes com hepatite C com nível de ALT normal, se comparados com pacientes com ALT alterada, em ambos os grupos

houve prevalência do genótipo 1, seguidos pelo 3 e pelo 2, respectivamente (57).

Dinçer et al. obtiveram os mesmos resultados, com o genótipo 1b, o mais freqüente em ambos os grupos de ALT normal ou não (58).

Estudo feito numa coorte de 60 pacientes colabora com esses dados. Dividindo-os em três grupos de 20 pacientes, dos quais o grupo I com pacientes com ALT normal; o grupo II, com nível ALT menos que duas vezes o limite; e grupo III, com nível elevado de ALT, verificou-se que nove pacientes (45%) tinham genótipo 1b e somente dois, do grupo I (10%), tinham o genótipo 1a comparado com 50% e 55% dos participantes do grupo II e grupo III, respectivamente (21).

Mathurim et al., também comparando pacientes com ALT normal e com ALT elevada, verificaram que o genótipo 1b foi o mais prevalente em ambos os grupos (45% dos casos) (25).

No entanto, a distribuição semelhante dos genótipos foi observada por Prati et al. (59), num grupo de pacientes doadores de sangue que persistiram com parâmetros de função hepática normal durante pelo menos 12 meses, verificaram que, nessa população, o genótipo 2 foi tão prevalente quanto o genótipo 1.

Essas discrepâncias podem ser explicadas em razão de diferentes características epidemiológicas, dentre elas diferenças geográficas e critérios de seleção.

Estudos prévios têm mostrado que a infecção com VHC por diferentes subtipos nem sempre resulta em carreador crônico de subtipos mistos (60).

2.6.7. Alanina aminotransferase (ALT)

A concentração sérica de ALT é a variável mais comum utilizada para avaliar doença hepática (61). A dosagem sérica de ALT é o teste mais barato e menos invasivo, mas um recurso insensível para acessar a atividade da doença.

Embora 6% das pessoas assintomáticas normais possam ter níveis de enzimas hepáticas anormais, a global prevalência de doença hepática na população geral é de somente 1% (62).

Regularmente, ambos os aminotransferases estão presentes no soro, em níveis baixos, atualmente com limite superior da normalidade de 30U/L para mulheres e 40 U/L para homens.

A concentração do AST (aspartato aminotransferase) é encontrada em nível decrescente no fígado, no músculo cardíaco, no músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas, pulmões, leucócitos e eritrócitos. O mais alto nível de ALT concentra-se no fígado cuja enzima é mais específica de lesão hepática.

Nos hepatócitos, a maioria da AST é localizada na mitocôndria, ao passo que ALT é exclusivamente localizada no citoplasma.

Quando da lesão da membrana do hepatócito, a liberação de ambas as enzimas se dá no sangue. Na hepatite C, a morte da célula hepática ocorre via apoptose (63), e acredita-se que a morte celular que ocorra via apoptose leva à hipótese de que essa célula sintetize menos ALT. Por isso, ainda por hipótese, levar a pobre correlação entre o grau de lesão da célula hepática e o nível de aminotransferase (58, 64, 65).

Há pesquisadores que recomendam o ajustamento dos valores das aminotransferases para os diferentes gêneros e o índice de massa corpórea (66).

Recentemente, Prati et al. (67) observaram que a atividade de ALT estava relacionada, de forma independente, a diversos fatores, dentre eles o IMC, marcadores laboratoriais de metabolismo anormal de lípidios ou carboidratos, idade, sexo, consumo de álcool, interação medicamentosa. Em razão disso, os autores recomendam que o atual limite superior-LSN da normalidade deveria ser revisado de forma decrescente, sugerindo um LSN 31U/L, para o gênero feminino, com $IMC \leq 23$, e 44 para $IMC > 23$ e 42, para o gênero masculino, com $IMC \leq 23$ e 66 para $IMC > 23$.

Sabe-se que o achado de um nível anormal de ALT pode levar à descoberta de infecção pelo VHC. Por isso, antes da identificação do VHC, a definição de hepatite não-A, não-B era baseada na documentação de persistentes valores anormais de ALT, fato esse baseado na comprovação, realizada em 1981, de um estudo dos vírus transmitidos por transfusão que revelou que o nível de ALT em doadores de sangue previa o risco de hepatite não-A, não-B em receptores de transfusão (68).

Assim que o vírus C foi identificado como causa da maioria das hepatites não-A, não-B, desenvolveram-se e introduziram-se, em 1992, técnicas sorológicas na triagem de doadores, o que resultou a questionar o valor de ALT. Em razão disso, em 1995, o Instituto Nacional de Saúde recomendou aos bancos de sangue que descontinuassem o uso de ALT em doadores (69).

Autores como Cable R. et al. (70), reforçaram essa recomendação mediante pesquisa da utilidade de ALT na triagem de doadores e constataram que, com a introdução dos testes imunoenzimáticos de segunda geração, o valor da dosagem de ALT havia declinado, uma vez que eles foram incapazes de detectar doadores com período de soroconversão mais tardio, o que foi constatado quando empregados exames mais sensíveis.

Atualmente, para seleção de doadores, os bancos de sangue se servem apenas dos testes anti-VHC e de critérios de restrição comportamental.

Estudos de coorte com pacientes com hepatite pós-transfusão ou de hepatite C adquirida na comunidade, mostraram que a maioria dos indivíduos (75%) tem persistente ou intermitente aumento dos níveis de ALT, o que é característica de pacientes com hepatite C crônica; entretanto, 20% a 30% deles apresentam níveis de transaminases persistentemente normais (2,31), mesmo com RNA VHC detectável no soro, cuja denominação empregada por alguns é de carreadores sadios do vírus C (3).

Essa denominação, cujo conceito é uma histologia hepática normal com presença de viremia, é amplamente contestada por outros autores (27, 56), pois estes concordam que a presença de RNA VHC sérico é invariavelmente associada à lesão hepática apesar de níveis de ALT persistentemente normais.

É bastante discutida qual deva ser o critério de ALT normal. O mais utilizado é baseado na proposta de Marcellin (31), em 1997, que foi revista

por Tassapoulos (2), em 1999, cujo diagnóstico de carreadores de VHC com ALT normal deve ser feito na presença de:

- anticorpos anti-VHC;
- presença de RNA-VHC por RT-PCR;
- níveis de ALT normal em pelo menos três testes, a cada dois meses,

durante um período de seis meses.

Puoti et al. (18) discordam desse conceito; eles acreditam que existam dois tipos de pacientes com ALT normal: os verdadeiros “bioquimicamente silenciosos” carreadores, com níveis persistentes de ALT normal e aqueles com testes intermitentemente normais.

Outro estudo realizado entre 1992 e 1999, com 135 pacientes anti-VHC positivos com níveis de ALT persistentemente normais, que foram acompanhados por 3,6 +/-2,3 anos (0,5 a 8,5 anos), em 94 deles foi detectado RNA viral, dos quais 21% experimentaram um aumento de ALT após um período médio de 2,9 +/- 1,2 anos após inclusão (71).

Gordon S. C. et al., ao analisar as elevações de ALT que ocorrem nos pacientes com ALT normal, defendem que a característica da hepatite C crônica é a flutuação dos valores de ALT, razão pela qual pacientes com ALT normal podem representar apenas “uma fotografia de um processo dinâmico”, na qual estão incluídos esses valores de ALT anormais (71).

Sabe-se que o atual limite superior para a ALT normal é 40U/L (30 a 50U/L), determinado por estudos conduzidos nos últimos dez anos com grupos de indivíduos saudáveis - doadores de sangue, estudantes de medicina e voluntários - ± 2 desvio-padrão, é o conceito estabelecido com

taxa normal para qualquer teste laboratorial. Inerente a essa definição de taxa normal, 5% dos resultados obtidos dos testes de pessoas normais encontra-se abaixo da definição de níveis normais, 2,5% dos quais podem ficar acima do limite superior da normalidade.

A população referência incluía muitos pacientes com esteato-hepatite não-alcoólica, atualmente reconhecida como a causa mais prevalente de doença hepática nos países em desenvolvimento. Os valores atuais de ALT subestimam a ocorrência de doença hepática crônica. A taxa de doenças hepáticas aumentou significativamente em muitos países, em virtude da dieta e dos comportamentos de risco, o que foi constatado por estudo realizado na Itália (67), que sugere ser prudente rever a tradicional definição universal de taxa normal de ALT em pacientes com hepatite C crônica.

2.6.8 Diagnóstico anatomopatológico

Atualmente, a biópsia hepática constitui o padrão ouro no diagnóstico de hepatite C crônica, graças a Paul Erlich, o primeiro a realizar uma biópsia percutânea em 1883, na Alemanha (72).

Progressivamente, as indicações de biópsia hepática tornaram-se valioso instrumento de diagnóstico e avaliação prognóstica. É de 1968 a primeira publicação da classificação das hepatites crônicas (73), que foram separadas em dois grupos: hepatite crônica ativa e hepatite crônica persistente.

O principal critério utilizado para essa classificação foi a integridade da placa limitante lobular.

A hepatite crônica ativa era definida como uma hepatite com graus variados de necrose em saca bocado e com comprometimento estrutural.

A hepatite crônica persistente era definida por uma placa limitante não-lesada, com uma história natural autolimitada sem evoluir para cirrose.

Em 1971 foi introduzido mais um tipo de hepatite, a hepatite crônica lobular, que se caracteriza pela permanência das alterações lobulares encontradas (73).

A seguir, Knodell et al. (74), em 1981, desenvolveram um índice de atividade histológica (HAI) baseado em quatro variáveis:

- necrose periportal - necrose em saca bocado;
- necrose lobular;
- infiltrado inflamatório portal;
- fibrose.

Embora esse trabalho tenha influenciado as classificações atualmente adotadas, há aspectos deles sujeitos a críticas, como a superposição de estadiamento e a atividade necroinflamatória.

Em 1991, Scheuer propôs uma nova classificação de hepatites crônicas, que compreende três considerações distintas:

- Etiologia - freqüentemente ela não pode ser determinada com certeza baseada apenas na histologia, uma vez que o diagnóstico é feito com base em outras pesquisas laboratoriais, o que exige uma necessária interação clínico e patologista.
- Atividade - relacionada à severidade e distribuição da atividade necroinflamatória, que significa agressão hepatocitária no momento

da biópsia e constitui um componente da doença que pode ser potencialmente tratado (75).

- Fibrose - marcador de progressiva lesão. É considerada uma conseqüência da extensão e de repetições da atividade necroinflamatória e da ativação de células estelares. É a menos provável de ser reversível (76).

Desse modo, podemos graduar a intensidade do processo necroinflamatório e estadiar a alteração estrutural presente.

A atividade necroinflamatória no fígado pode ser dividida em dois componentes. O primeiro compreende o trato portal com variável extensão na região periportal adjacente. O segundo compreende o parênquima hepático. Ambos os padrões de inflamação são provavelmente relacionados aos trajetos que as células inflamatórias podem ganhar para o fígado:

- Portal/periportal - a migração das células inflamatórias ocorre mediante o endotélio dos vasos portais pelo tecido conectivo rico em células apresentadoras de antígenos.

Um predominante infiltrado inflamatório portal é uma das características histológicas da hepatite crônica, aliás, pré-requisito para seu diagnóstico.

Entretanto, convém lembrar que apenas hepatite portal não necessariamente confirma diagnóstico de hepatite crônica, uma vez que o infiltrado portal pode ser detectado em várias doenças, mesmo as doenças sistêmicas (75).

A extensão do infiltrado inflamatório portal no parênquima hepático adjacente acarreta lesões na interface do espaço portal. No entanto, a denominada necrose em saca bocado ou necrose linfocítica, é um conceito atualmente considerado impróprio, visto que há evidências de que a morte dos hepatócitos periportal é mediada pela apoptose e não pela necrose, que, atualmente é chamada, hepatite de interface.

- Parênquima - a migração das células inflamatórias ocorre por meio do endotélio do sinusóide hepático, quando ganha diretamente acesso ao parênquima hepático, onde acarreta necrose focal (*spotty*).

Sabemos que a maior conseqüência da hepatite C crônica é a progressão da cirrose e potencial complicações: hemorragia, insuficiência hepática e câncer primário do fígado.

Hepatite C é uma doença viral, mas, principalmente, uma doença fibrótica (76).

Fibrose é caracterizada pelo depósito de componentes da *matrix* extracelular - colágeno, fibronectina e laminina –, que leva à distorção da arquitetura hepática com comprometimento da microcirculação do fígado e da função das células hepáticas.

Na maioria dos casos inicia-se com a expansão dos tratos portais associada à hepatite de interface, à progressão da fibrose e à formação dos septos.

A inflamação lobular, particularmente em área de necrose em ponte, pode formar septos porta-centro, considerados marcadores de maior significância na evolução para a cirrose.

Outros achados histológicos característicos de infecção pelo vírus C incluem folículos ou agregados linfóides portais, identificados como agregados circunscritos de linfócitos e ocasionais plasmócitos nos espaços porta, com ou sem centro germinativo evidente.

Agressão ao ducto biliar e esteatose também são achados característicos, dos quais este tem sido demonstrado que, de acordo com a presença e a intensidade, está relacionado ao grau de fibrose e à atividade necroinflamatória.

Em 1995, Ishak et al. publicaram uma classificação mais pormenorizada, que corresponde a uma revisão da classificação de Knodell.

Ela adota uma escala numérica não-interrompida e separa a atividade necroinflamatória da fibrose, além de reforçar o uso do termo hepatite de interface, ao reconhecer o valor da apoptose.

Tendo em vista a relevância da atividade necroinflamatória na decisão terapêutica e seu papel fundamental como preditor de evolução para fibrose e cirrose, Bedossa e Poynard (77) propuseram um algoritmo simples e com mais reprodutibilidade para gerar um escore de atividade necroinflamatória (Tabela 1).

Para tanto, consideraram apenas a necrose em saca-bocado - hepatite de interface - e a necrose lobular - parenquimatosa -, excluindo a inflamação portal que se superpõe à necrose em saca bocado e é inespecífica.

A hepatite de interface foi relacionada a uma evolução mais branda, ao passo que a atividade parenquimatosa, a uma maior evolução para a fibrose.

Tabela 1 - Sistema Metavir para análise da fibrose e atividade inflamatória hepática

| ATIVIDADE INFLAMATÓRIA HEPÁTICA | FIBROSE |
|--|--------------------------------------|
| A = atividade histológica | F = fibrose |
| A0 = sem atividade | F0 = fibrose ausente |
| A1 = atividade leve | F1 = fibrose portal septo |
| A2 = atividade moderada | F2 = fibrose portal com raros septos |
| A3 = atividade severa | F3 = numerosos septos sem cirrose |
| | F4 = cirrose |

Em 2000, surgiu a classificação proposta pela Sociedade Brasileira de Patologia, SBP (Tabela 2), agora utilizada em nosso meio (73).

Tabela 2 - Classificação das Hepatites Virais Crônicas (Sociedade Brasileira de Patologia)

ESTADIAMENTO

Alterações estruturais

- 0 - arquitetura lobular normal
- 1 - expansão fibrosa portal
- 2 - expansão fibrosa portal com septos porta-porta
- 3 - transformação nodular
- 4 - cirrose

Infiltrado inflamatório portal/septal

- 0 - raros linfócitos portais
- 1 - aumento discreto dos linfócitos portais
- 2 - aumento moderado dos linfócitos portais
- 3 - aumento acentuado dos linfócitos portais
- 4 - aumento muito acentuado dos linfócitos portais

Atividade periportal/ periseptal

- 0 - ausência de lesões de interface espaço porta/parenquimatosa
- 1 - extravasamento de linfócitos para a interface *spill over* - não caracterizando a presença de necrose em saca-bocado
- 2 - necrose em saca-bocado discreta
- 3 - necrose em saca-bocado moderada
- 4 - necrose em saca-bocado acentuada

Atividade parenquimatosa

- 0 - hepatócitos normais
 - 1 - alterações discretas de hepatócitos, com raros focos de necrose
 - 2 - necrose focal de hepatócitos em numerosos sítios
 - 3 - áreas limitadas de necrose confluyente
 - 4 - necrose confluyente extensa, múltipla
-

A literatura tem mostrado que não há correlação entre nível de ALT e aspectos anatomopatológicos.

A decisão de submeter pacientes com hepatite C crônica e ALT normal a realizarem rotineiramente biópsia hepática permanece controversa, uma vez que, nessa população, se comparada aos pacientes com níveis elevados de ALT, ocorre significativamente menor taxa de proliferação do hepatócito, menor taxa de apoptose e lesões histológicas mais leves (78).

Outros autores defendem a realização seletiva da biópsia hepática, melhor que na rotina de pacientes com ALT normal. Para esses autores, deve-se discutir esse procedimento com o paciente, uma vez que uma biópsia pode ser útil para ele, caso exista interesse em tratamento conservador e expressa vontade de adiar o tratamento (79).

Esses autores apontam os seguintes benefícios e malefícios de uma biópsia hepática seletiva e de rotina:

ALT normal: biópsia na rotina versus biópsia hepática seletiva

- Benefícios de biópsia hepática de rotina - é o padrão-ouro para graduação e estadiamento de severidade de doença hepática; utilizada para auxiliar o tempo de terapia antiviral, especialmente em pacientes com genótipo 1, cuja resposta virológica sustentada é menor e requer mais tempo de tratamento; diagnóstico de doenças hepáticas co-existentes (incomum); identificação de pequeno número de pacientes com cirrose, os quais podem beneficiar no *screening* para carcinoma hepatocelular.

- Fundamentos para biópsia hepática seletiva - com alta taxa de resposta virológica sustentada em pacientes com genótipos 2 e 3, a realização de biópsia hepática de rotina é opcional; procedimento invasivo com risco de complicações; análise favorável de custo-efetividade para tratamento sem biópsia; preferência dos pacientes em não ser submetidos a biópsia, com ou sem tratamento.

Considerando a indicação seletiva de biópsia hepática, alguns autores advogam que esse procedimento é de um valor inquestionável em pacientes com doença hepática crônica (80).

Nesse mesmo sentido, um trabalho realizado com o objetivo de comparar a biópsia hepática de 35 pacientes com ALT normal pareados com outros 35 com ALT elevada, concluiu-se que há validade em biopsiar todos os pacientes com hepatite C crônica, em razão do baixo custo e da seguridade da biópsia hepática, do alto custo da morbidade da terapia com Interferon e de 20% dos pacientes com ALT normal, nesse trabalho, apresentarem doença hepática avançada (81).

Trabalho publicado recentemente também reforça a recomendação de biopsiar os pacientes com hepatite C e ALT normal, visto que, para avaliar a severidade da doença hepática, essa enzima é um “pobre marcador substituto” (82).

Poynard et al. (76) também afirmam que não existe marcador substituto para pacientes com ALT normal e lesão mínima, razão pela qual eles continuam a biopsiar tais pacientes.

Entretanto, alguns autores acreditam que, como esse grupo de pacientes com hepatite C e ALT normal mostra lesão mínima ou leve à biópsia hepática, pode ser desnecessário submetê-los a tal procedimento.

Mediante estudo caso-controle de 32 casos com hepatite C e ALT normal, comparados a pacientes com ALT elevada, constatou-se que apenas um paciente tinha fígado normal; 56,3% deles tinham hepatite crônica mínima e 40,6%, hepatite crônica leve (83).

Para sustentar o conceito de que a história natural desse grupo de pacientes é caracterizada por progressão muito lenta ou não-progressão, um grupo de pesquisadores italianos observou durante um período de mais de cinco anos que não houve piora histológica em pacientes com ALT normal (27).

Com a finalidade de avaliar a necessidade de rebiopsiar pacientes com VHC e ALT normal, Martinot-Peignoux et al. (57) constataram, em 24 pacientes com anti-VHC e RNA viral positivo, dos quais 11 apresentavam níveis de ALT normal e 13, aumento dos níveis de ALT e doença histológica leve e estável, durante 2 a 4 anos, sugerindo estes autores que esse grupo não necessita repetir biópsia hepática.

Cividini et al. (84) estudaram durante sete anos uma coorte de 118 doadores de sangue com persistente ALT normal e anti-VHC reagentes, dos quais 62 (52,5%) permaneceram no decorrer dos sete anos, e 56, por desmotivação, foram se retirando. Em 33 deles foi feita biópsia hepática e em 18, repetida, em média seis anos depois da primeira.

A graduação histológica não se alterou na maioria dos pacientes. Encontrou-se uma significativa progressão de fibrose (> 2 pontos no escore) em 17% dos pacientes com ALT normal. Somente um paciente, cuja primeira biópsia mostrou hepatite crônica de leve intensidade, desenvolveu carcinoma hepatocelular em fígado com cirrose bem-compensada, após cinco anos de seguimento, a despeito de ALT persistentemente normal.

Há consenso na literatura de que a progressão de fibrose nesses pacientes é menor que em pacientes com ALT elevada.

Globalmente, a freqüência de histologia hepática normal varia entre 0% e 20%.

Trabalho publicado em 1993, que estudou quatro pacientes, um homem e três mulheres, anti-HVC e RNA VHC positivos e ALT normal, submetidos à biópsia hepática, revelou histologia normal em todos os casos (3).

Pesquisa realizada na França numa população de 102 pacientes com ALT normal e VHC encontrou 20% dos pacientes sem lesão histológica pelo escore Metavir (25).

No entanto, uma análise feita em 75 pacientes contesta esses achados anteriores, uma vez que seus autores não encontraram nenhum paciente sem lesão à biópsia (20).

Mais recentemente, alguns pesquisadores também constataram esse mesmo achado numa revisão retrospectiva realizada entre 1993 e 1999, entre 91 pacientes com ALT normal, nenhum tinha histologia hepática normal (85).

Concordam os autores que o grau de lesão de doença hepática varia de mínima a leve na maioria dos pacientes com ALT normal.

Em estudo de caso-controle realizado com 32 pacientes-casos, 18 deles (56,3%) apresentaram hepatite crônica mínima e 13 (40,6%), hepatite crônica leve, ao contrário dos controles que 7 (21,9%) mostraram hepatite mínima, e 3 (9,3%), hepatite crônica moderada (83).

Estudo multicêntrico realizado na Itália em 159 pacientes submetidos à biópsia hepática revelou 27 deles (17%), com fígado sem alterações, 70 (44%), com hepatite leve e 6 (4%), com hepatite moderada (22).

Com a finalidade de determinar a prevalência e severidade da infecção por VHC em pacientes assintomáticos, realizou-se um estudo transversal, de base populacional, com 4.820 pacientes que participavam de um programa de triagem para fatores de risco cardiovascular e foram submetidos à sorologia anti-VHC. Para o anti-VHC, 116 apresentaram resultados positivos e 85, RNA-VHC detectável. Dentre esses 85, 39 (46%) tinham níveis de ALT normal em zero, durante um, três e seis meses, e 37 (43,5%) ALT elevada.

Setenta e oito das 85 pessoas que possuíam RNA VHC detectável foram submetidos à biópsia hepática, sendo 32 pessoas com ALT normal e 46 pessoas com ALT elevada. Os autores usaram o escore Metavir para classificação das biópsias e encontraram 100% dos pacientes com ALT normal atividade necroinflamatória A0-A1; 19% com ALT normal significativa fibrose (F2 a F4), comparados a 52% dos pacientes com ALT elevada. Com base de escore de fibrose de 2 ou maior ou atividade de 2 ou maior, foi

observada moderada a severa hepatite crônica em 28 dos 46 pacientes com ALT elevada 61%-IC,45,4% -74,95, e em 6 dos 32, 19%IC-7, 21% -36, 4% $p<0.001$ (33).

Quanto à prevalência de cirrose, as taxas variam de zero a 20%.

Num estudo controlado randomizado com o objetivo de avaliar resposta de tratamento em pacientes com ALT normal, de uma amostra de 53 pacientes com RNA VHC detectável, 37 pacientes realizaram biópsia, que mostrou tecido normal em 6 (16%) deles, hepatite crônica com mínima/leve atividade em 21 (57%) e hepatite com moderada atividade em 10 (27%) e nenhum paciente apresentou cirrose (86).

Martinot-Peignoux et al. (71) realizaram biópsia hepática em 108 de 135 pacientes com ALT normal (80%), dos quais 94 (69%) tinham RNA VHC detectado e 41 (51%), sem RNA VHC detectado. A maioria dos pacientes com ALT normal apresentaram baixo grau de lesão histológica; somente 6 deles (5%) tinham escore de fibrose >2 (todos com RNA positivo) e nenhum apresentou cirrose.

Outro estudo com pacientes com 80 ALT normal pareados com outros 455 com ALT elevada mostrou que a cirrose foi menos freqüente no grupo com ALT normal (4%), em contraste com 13% com ALT elevada ($p<0.0001$) (24).

Levando em conta que pacientes com ALT normal têm menor lesão hepática que pacientes com ALT elevada, pesquisa realizada em 35 pacientes com ALT normal (grupo 1), comparados com 58 pacientes com níveis elevados de ALT (grupo 2), mostrou significante menor escore

($p < 0.05$) de inflamação e fibrose em relação ao grupo 2. Doença hepática avançada, definida como fibrose em ponte e cirrose, foi observada em somente 4 (11,4%) dos 35 pacientes e em 37% dos pacientes com ALT elevada (87).

Seguimento realizado em 36 pacientes com vírus C e ALT normal de uma população de 1,2 mil pacientes, o que corresponde a 3%, analisando a clínica, virologia, histopatologia e características biológicas, encontrou 20% dos pacientes da amostra com extensa fibrose ou cirrose (56).

2.7. Tratamento

Os ensaios clínicos iniciais de tratamento com Interferon para pacientes com hepatite C crônica incluíam somente pacientes cujos níveis de ALT fossem maiores que 1,5 vez o limite superior da normalidade antes do tratamento (86).

Em 1997, o NIH recomendou que pacientes com hepatite C crônica e ALT persistentemente normais não fossem tratados senão segundo protocolos clínicos, uma vez que, com terapia, os pacientes não haviam experimentado benefício clínico nenhum, além de possíveis pioras no curso da doença, seja em razão da toxicidade direta, seja do efeito imunomodulador, resultado da ativação da resposta citotóxica aos hepatócitos infectados (31).

Esse consenso foi baseado em estudos que incluíram 87 pacientes tratados com Interferon (monoterapia), a maioria dos quais durante 24 semanas, e outros, por 48 semanas. Obteve-se uma taxa global de resposta

sustentada de 19% em pacientes com ALT normal, comparada a 12%, com ALT elevada, sendo que 30 deles apresentaram elevação de ALT durante o tratamento e alguns após a descontinuação da terapia.

Sangiovanni et al. (87), ao estudarem pacientes com ALT normal, randomizaram 31 pacientes para receber Interferon alfa 3.000.000 U, 3 vezes/semana por seis meses 2a (n=16) ou não (n=15). Todos os pacientes foram seguidos pelo menos durante seis meses após o final do tratamento. Em 15 pacientes (94%) e 14 controles (93%), no fim do tratamento, foi detectado VHC RNA. Em 10 pacientes (62%) e em um controle (7%) $p < 0.005$ que receberam Interferon, ocorreu elevação dos níveis de ALT.

Considerando que, depois de seis meses de tratamento com Interferon alfa 2a, não houve erradicação do RNA VHC dos pacientes com ALT normal, além de em 2/3 deles ocorrer elevação de ALT, os autores concluíram que esses pacientes não devem ser tratados com Interferon.

Contrariamente a esse estudo, Shiffman et al. (88) estudaram 99 pacientes com VHC, dos quais 35, que tinham ALT normal, foram randomizados para tratamento com Interferon diário por três meses, depois, três vezes/semana, durante 12 meses (grupo A) e/ou três vezes/semana (grupo B). Depois de três meses de tratamento, 38,3% dos pacientes do grupo A foram negativos para RNA VHC, ao passo que 18,8% do grupo B $p < 0.05$.

No entanto, com a redução da dose de Interferon de diária para três vezes/semana no grupo A, a porcentagem de pacientes com RNA viral negativo declinou. A resposta virológica sustentada foi similar em pacientes

com ALT normal (10.6%) ou elevada (8.3%). E esse grupo também encontrou elevação dos níveis de ALT acima dos níveis pré-tratamento, em pacientes com ALT elevada ~34% comparado com ~30% dos pacientes com ALT normal.

Sugerindo, no entanto, de que pacientes com hepatite C não devem ser excluídos de terapia com Interferon, em virtude, simplesmente, do conceito de que ALT pode tornar-se elevada durante a terapia.

Para determinar se pacientes com ALT normal clareiam a infecção por VHC igual ou diferentemente de pacientes com ALT elevada, Mangia et al. (89) conduziram um estudo multicêntrico, controlado, pareando 35 pacientes com ALT normal - mensurada a cada dois meses, durante 12 meses - e outros 105 com ALT elevada.

Todos os pacientes receberam, durante 12 meses, Interferon alfa 2b - 3 milhões de unidades - três vezes/semana, em combinação com Ribavirina 1.000mg ou 1.200mg, para pacientes com <75kg ou >75kg, respectivamente. Ao final do tratamento, em 25/35 pacientes com ALT normal e em 55/105 com ALT elevada, $p=0.04$, foi encontrada clearance viral.

Em 22 pacientes com ALT normal (62,8%; 95% IC, 46.8-78.1) e em 50 pacientes com ALT elevada (47,5%; 95% IC, 38.0-57.1), obteve-se resposta virológica sustentada. Os autores do estudo chegaram à conclusão de que a resposta virológica sustentada induzida por Interferon e Ribavirina é comparável em pacientes com ALT normal ou elevada.

Finalmente, em 2002, o NIH, Instituto Nacional de Saúde, dos EUA (6), recomendou que, embora a maioria dos pacientes com ALT normal tenha doença leve, histologicamente alguns possam progredir para fibrose avançada e cirrose, e embora os *experts* discordem de biopsiar e tratar esses pacientes, o tratamento deve ser baseado em numerosos fatores, dentre eles o genótipo favorável, a ocorrência de fibrose, a motivação do paciente, sua sintomatologia e idade.

3. JUSTIFICATIVA

A infecção pelo vírus C atualmente acomete 200.000.000 de pessoas no mundo, constitui-se uma doença crônica, fibrosante (76), que pode evoluir para cirrose, em média, em 20 a 30% dos pacientes, e que utiliza a atividade sérica de ALT como marcador para avaliar o grau de lesão hepática, a despeito de a literatura constatar que não há correlação positiva entre estas duas variáveis.

Em vista da OMS estimar que 3% da população mundial seja portadora do vírus C e sendo no Brasil a prevalência de pacientes com hepatite C crônica em torno de 1,5% (90), entretanto, a prevalência de pacientes com ALT normal é desconhecida, temos como proposta estimar a prevalência de pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT no ambulatório de hepatites da Divisão de Clínicas de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Sabemos que de acordo com o grau de heterogeneidade do vírus C, podemos ter ampla distribuição geográfica mundial, diferenças na patogenia como demonstrado por Prati D et al (59) e na resposta ao tratamento, assim sendo, justifica-se a realização desta pesquisa para descrever as características genóticas e aspectos anátomopatológicos de pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT.

4. OBJETIVOS

- Estimar a prevalência de pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT em um ambulatório especializado no atendimento de pacientes com hepatites virais.

- Descrever as características genóticas e aspectos anatomopatológicos de pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT.

- Descrever as características demográficas de pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT.

5. MÉTODOS

5.1. Desenho do estudo

Estudo de série de casos.

5.2. Local do estudo

A pesquisa foi desenvolvida no Ambulatório de Hepatites Virais da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Trata-se de um hospital terciário no qual funciona esse ambulatório, criado em 1987, que é um centro de referência para hepatites virais do Programa de Hepatites Virais da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. É um ambulatório especializado no tratamento de pacientes com hepatite C crônica, cujo coordenador é o Professor Doutor Antonio Alci Barone.

Atualmente estão matriculados cerca de 4 mil pacientes, sendo que há cerca de 800 estão em seguimento.

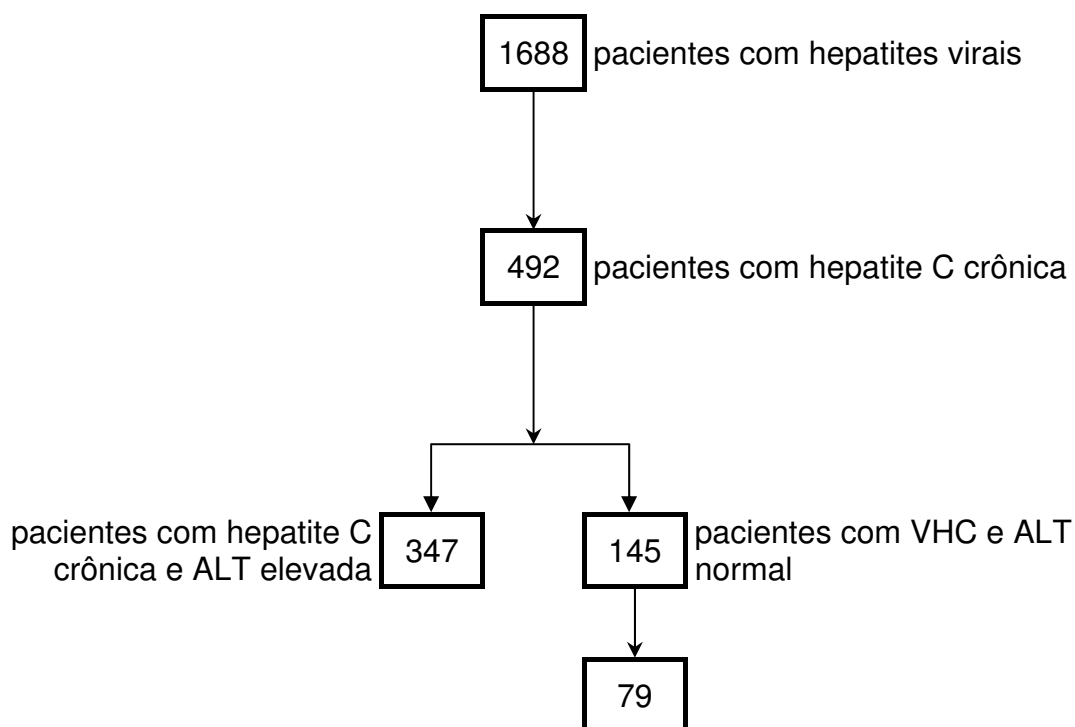
5.3. População estudada:

Pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, de 1º de janeiro de 1997 a 30 de abril de 2000 para tratamento de hepatite C crônica. Essa população é composta por pacientes de ambos os sexos, com faixa

etária de 18 anos de idade ou mais, residentes na cidade de São Paulo ou no estado de São Paulo, provenientes na sua grande maioria do banco de sangue da Fundação Hemocentro de São Paulo ou de outras clínicas do próprio Hospital das Clínicas, ou mesmo referidos de outros serviços.

5.3.1. Tamanho da amostra

Em investigação realizada no SAME-Serviço de Arquivo Médico, durante o período de 1º de janeiro de 1997 a 30 de abril de 2000, foram atendidos 1688 pacientes com diagnóstico de hepatites virais. Com esse grupo com o auxílio dos dados informatizados do laboratório Central do HC-FMUSP, encontramos 492 pacientes com hepatite C crônica, dos quais 347 com hepatite C crônica e ALT elevada e 145 com ALT normal, dos quais 79 com hepatite C crônica e no mínimo, três dosagens de ALT dentro do normal ou até 1,5 vez o LSN durante 12 meses. A distribuição dos pacientes encontra-se no fluxograma abaixo:



NOTA: Pacientes com Hepatite C crônica e ALT normal ou até 1,5 vez o LSN, no mínimo três vezes durante 12 mese, dos quais que 68 foram submetidos ao estudo anatomopatológico.

5.3.2. Definição de caso

Foram considerados casos de pacientes que tivessem sorologia reagente contra o VHC (método imunoenzimático) ELISA de II e III geração, PCR qualitativo e/ou quantitativo detectado, no mínimo três dosagens bioquímicas de ALT normais ou até 1,5 vez o LSN durante 12 meses, bem como amostra representativa de tecido hepático.

5.3.3. Critérios de inclusão

Foram incluídos os pacientes que preencheram os seguintes critérios:

- presença de anticorpo contra o VHC, medido por Elisa (método imunoenzimático) de II e III geração;

- PCR qualitativo e/ou quantitativo do VHC detectado;
- medida sérica de no mínimo três ALT normal ou até 1,5 vez o limite superior da normalidade, durante 12 meses;
- biópsia hepática.

5.3.4. Critérios de exclusão

- sorologia reagente para vírus C, por meio de testes imunoenzimáticos, ELISA de II e III geração, mas com PCR RNA não detectado;
- dosagens bioquímicas de ALT com valor acima de 1,5 vez o limite superior da normalidade;
- portador de hepatite B ou HIV 1 e 2;
- portador de outra hepatopatia.

5.3.5. Coleta de dados

O departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias possui um ambulatório que atende pacientes com hepatites virais. Identificamos os pacientes através de verificação da lista de pacientes assistidos no ambulatório, fornecida pelo SAME, neste período.

A partir desse grupo e com o auxílio dos dados informatizados do Laboratório Central do HC-FMUSP, selecionamos os pacientes que possuíam sorologia para hepatite C reagente e dosagens de ALT dentro dos critérios de seleção.

Solicitamos prontuários médicos no SAME e através de um protocolo padronizado (Anexo A), coletamos as seguintes informações: gênero, idade, sorologia anti-VHC, presença de PCR VHC quantitativo ou qualitativo, medida de ALT e o estudo anatomopatológico de fragmento hepático.

5.4. Aspectos éticos da pesquisa

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, não foi feito, uma vez que este projeto foi desenvolvido por meio de análise retrospectiva de prontuários, para verificação de prevalência e de aspectos anatomopatológicos. Entretanto, os autores se comprometem a manter sigilo absoluto sobre a identificação desses pacientes bem como sobre os dados obtidos de seus prontuários.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias e pela CAPPesq do Hospital das Clínicas, sob o número 962/02.

5.5. Exames laboratoriais utilizados

Os exames bioquímicos de rotina foram realizados pelo Laboratório Central do HC-FMUSP com a metodologia padronizada pelo fabricante Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA. Até abril de 1998 os valores de ALT eram de 0-18 U/L, então passaram 10-44U/L para gênero masculino e a 10-36U/L para feminino.

As biópsias hepáticas foram realizadas por via percutânea, pelos residentes do departamento, com ultrassonografia prévia, utilizando-se

agulha de Tru-cut durante o período de 1º de janeiro de 1997 até a primeiro semestre de 1999. Dessa data em diante até 30 de abril de 2000 utilizou-se agulha Hepafix. Os espécimes foram fixados em formalina a 10% e os cortes foram submetidos à coloração com hematoxilina-eosina, Perls, tricrômio de Masson e reticulina.

As lâminas foram revisadas por um único patologista, que utilizou a classificação histopatológica e estadiamento das hepatites crônicas da Sociedade Brasileira de Patologia (73). De acordo com essa classificação, do total de pacientes incluídos no estudo, foi calculada a proporção daqueles com alterações estruturais do fragmento hepático com pontuação de 0 a 1 e a daqueles com alteração estrutural com pontuação de 2 a 4. Eles foram separados em duas categorias uma vez que de acordo com a literatura, a progressão da fibrose representa um importante momento de evolução das hepatites crônicas, cuja correlação entre estágio e risco de progressão para cirrose é muito significativa (91).

Calculamos a proporção de pacientes incluídos no estudo com atividade peri-portal, descrito previamente, pontuada de 0 a 1 e de 2 a 4, proporção essa segundo a qual há uma correlação da intensidade da atividade peri-portal e com a progressão para fibrose mais acentuada (91).

Quanto a genotipagem, foi realizada com material estocado dos pacientes no Laboratório de Investigação Médica - LIM 47. O sangue dos pacientes foi coletado por punção venosa a vácuo, com uso de tubo seco de 10ml. Destas amostras foram separados os soros, em prazo máximo de 4

horas após coleta, por centrifugação a 1.500 rpm/10min. Aliquotados e conservados a -70°C até o uso.

Foi avaliada a região 5'NC do VHC nos testes de PCR e genotipagem.

5.5.1 Genotipagem pelo método de seqüenciamento do VHC

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR-VHC).

5.5.2 Região 5'NC-VHC

Para esta reação de PCR foi utilizado o Protocolo Amplicor ROCHE Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA para a geração de produtos que foram base para a genotipagem utilizando a Região 5'NC do VHC (92).

Extração do RNA

- Foi distribuído 400µl de solução de lise por tubo de amostra.
- Adicionou-se 200µl de amostra de soro para cada tubo contendo solução de lise.
- Foram preparados controles negativo e positivo simultaneamente.
- Todos os tubos foram incubados à 60°C/10min.
- Adicionado 600µl de Isopropanol, temperatura ambiente, a cada amostra e centrifugado a 13.000rpm/15min.
- Retirado sobrenadante e acrescentado 1ml de Etanol 70%; centrifugado a 13.000rpm/5min.
- Retirado o sobrenadante, foi dissolvido o sedimento com 200µl de

tampão.

Transcrição Reversa (RT) e Amplificação da Partícula VHC

- Tampão MMX: Tampão de Bicina, 16%DMSO, Glicerol, <0,01% de Tth Polimerase do ADN, Acetato de Potássio, <0,001% de dATP, dCTP, dGTP, dUTP, 0,005% de iniciadores KY78 e KY80 (sendo um deles biotinizado), <0,01% de AmpErase, 0,05 de Azida sódica.

- Transferido 50µl do RNA extraído de cada amostra para um tubo contendo 50µl de tampão MMX, com Mn².

Em seguida as amostras foram submetidas ao seguinte programa de temperaturas (Tabela 3):

Tabela 3 - Ciclos de temperatura e tempo da Transcrição Reversa (RT) e PCR-VHC

| | TEMPERATURA | TEMPO | |
|----------------------|----------------------|--------------|----------|
| RT | 50 °C | 5 min | |
| | 62 °C | 30 min | |
| <i>Seguidos por:</i> | | | |
| PCR-VHC | 90 °C | 10 seg | 37 vezes |
| | 58 °C | 25 seg | |
| | <i>Seguidos por:</i> | | |
| | 91 °C | 3 horas | Máximo |

NOTA: Termociclador Perkin-Elmer 9.700 rampa - 1grau /seg.

- Pipetado 100µl de solução de desnaturação para cada amostra, em temperatura 91°C.

Neste ponto a reação pode ser mantida à 4°C por no máximo 1 semana.

Detecção do produto da PCR

- Para cada poço da placa de ELISA foi pipetado 100µl de solução de hibridização.

- Seguido de 25µl do produto amplificado e desnaturado a cada 2 poços, sendo um teste e outro controle.

- Incubação de 37°C por 1 hora e lavagem.

- Adicionado 100µl de solução de conjugado de Avidina-Peroxidase de Rábano silvestre e incubado a 37°C por 15 min. Seguido de lavagem.

- Adicionado 100µl de substrato TMB (3,3' 5,5' Tetrametilbenzidina) e incubado por 10min. À temperatura ambiente e ausência de luz.

- Finalmente, 100µl de reagente de parada (4,9% de Ácido Sulfúrico) em cada poço.

A leitura foi feita em espectrofotômetro com filtro de 450nm.

Tabela 4 - Interpretação de resultados

| RESULTADO DA SMOSTRA A 450nm | RESULTADO DO CONTROLE INTERNO A450nm | INTERPRETAÇÃO (RNA-VHC) |
|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
| <0,3 | ≥0,3 | Não detectado |
| 0,3 | <0,3 | Reação inibida, repetir teste |
| ≥0,3 | Qualquer | Detectado |
| >0,3<1,0 | Qualquer | Inconclusivo, solicitar nova coleta |

Genotipagem do VHC

Nesta etapa, a PCR-VHC-genotipagem tem como objetivo preparar produtos de PCR-VHC, já amplificados anteriormente, para a análise específica pelos equipamentos programados (seqüenciadores) para determinação dos tipos virais do VHC.

Purificação dos produtos da PCR-VHC

Os produtos obtidos pelas reações da PCR-VHC, região 5'NC, sofreram o mesmo processo de purificação, propostos pelo protocolo QUIAGEN, descrito a seguir:

- Foi adicionado 5 volumes de tampão para 1 de produto da PCR-VHC e posterior agitação.

- Transferiu-se 2ml desse volume para o tubo contendo a coluna de purificação QIAquick (QIAquick Spin Handbook QUIAGEN) seguido de centrifugação por 30-60 segundos.

- Descartado o material que passou, a coluna foi lavada com 0.5ml de tampão PE e centrifugado por 30-60 segundos, por duas vezes.

- Descartado o líquido resultante, foi feita centrifugação por 1 minuto adicional.

- Para eluir o RNA, foi adicionado 50µl de tampão EB (10mM Tris-HCl, pH8.5) sobre a membrana QIAquick com centrifugação de 1 minuto.

PCR-VHC para o seqüenciamento

Seguimos com as reações de PCR-genotipagem, onde os produtos anteriormente amplificados serão preparados para o processo de leitura do seqüenciador. Para ambas reações, referentes à região 5'NC, foram utilizados protocolo CLIP de Seqüenciamento (Bayer Health Care Diagnostics, Tarrytown, NY, USA) (92, 94).

Região 5'NC-VHC (92, 94, 95)

Tampão CLIP 1: Ao seu volume total de 21 µl, foi acrescentado 4 µl do produto da PCR, purificado.

1) Tampão CLIP 1, para cada amostra:

- 12.75 µl água livre de Rnase
- 2.50 µl Tampão Clip VHC 5'NC
- 2.50 µl DMSO
- 1.00 µl 5'iniciador PCS5b (3pmol)
- 1.00 µl 3'iniciador PCAS5b (3pmol)
- 1.25 µl enzima TS (diluído 1:10)

2) Volume total de tampão (CLIP 1) por amostra de 21 μ l, foi acrescentado 4 μ l produto purificado. Transferiu-se 5 μ l desta solução para tubos contendo 3 μ l de tampão de terminação específico para cada base (A, C, T e G), perfazendo uma linha de quatro tubos por amostra com volume total de 8 μ l.

3) Agitado e Centrifugado.

4) Programa de temperaturas programado em para a PCR do seqüenciamento Região 5'NC.

Tabela 5 - Ciclos de temperatura e tempo da reação de seqüenciamento para Genotipagem

Região 5'NC do VHC

| | TEMPERATURA | TEMPO | |
|----------------------|-------------|----------|----------|
| DESNATURAÇÃO | 95°C | 1 min | |
| <i>Seguidos por:</i> | | | |
| DESNATURAÇÃO | 95°C | 30 seg | 30 vezes |
| ANELAMENTO | 45°C | 30 seg | |
| <i>Seguidos por:</i> | | | |
| RESFRIAMENTO | 4°C | ∞ | |

NOTA: Termociclador Perkin-Elmer 9.700 rampa - 1grau /seg.

5) A reação foi interrompida com 12 μ l de solução de parada (formamida 95% e Fucsina), para cada tubo. Seguida de centrifugação e nova desnaturação.

Tabela 6 - Ciclos de temperatura e tempo da reação de desnaturação***Região 5'NC do VHC***

| | TEMPERATURA | TEMPO |
|----------------------|--------------------|--------------|
| DESNATURAÇÃO | 85 °C | 3 min |
| <i>Seguidos por:</i> | | |
| RESFRIAMENTO | 4 °C | ∞ |

NOTA: Termociclador Perkin-Elmer 9.700 rampa - 1grau /seg.

Seqüenciamento: Região 5'NC do VHC

Nesta etapa, temos o auxílio do seqüenciador para captura e interpretação dos sinais emitidos pelas seqüências, anterior e especialmente processadas. Seguimos com o auxílio de um programa de computador específico (The OpenGene System, Bayer Health Care Diagnostics, Tarrytown, NY, USA) que compreende um software de análise das cadeias para a região 5'NC do VHC (89, 94, 95).

Para as leituras, a eletroforese dos produtos do seqüenciamento CLIP-HCV foi feita estando conectada ao seqüenciador e ao computador. O Sistema OpenGene inclui o software de análise das cadeias, gel de acrilamida, unidade de foto-polimerização (SureFill) acoplado a torre do seqüenciador em sistema automatizado e sobre as seguintes condições:

- Temperatura: 53°C
- Voltagem: 1.300V
- Potência do Laser: 50%

- Amostragem: 0.5 seg/amostra
- Heterozigosidade: 50%
- Distância entre os picos: 7.5
- Tempo de corrida: 25 min.

Pronto o gel de acrilamida, acoplado à torre do seqüenciador, foram aplicadas 1.5 µl das amostras por coluna, 4 colunas por amostra (ACTG).

Para a análise dos tipos e subtipos, pela região 5'NC, foi utilizado software OpenGene DNA Sequencing System (Bayer) em conjunto com a biblioteca TRUGENE HCV 5'NC (Bayer Health Care Diagnostics, Tarrytown, NY, USA), que consiste em seqüências do GeneBank e seqüências confirmadas por seqüenciamento de outras regiões do genoma do VHC. As seqüências são referentes à posição de 96 a 282 da região 5'NC do VHC.

Serotipagem do VHC

O diagnóstico sorológico dos tipos do VHC foi realizado com a metodologia descrita por Simmonds e cols. e trata-se de teste comercialmente disponível no mercado (Murex HCV Serotyping 1-6 Assay).

O mapeamento dos epítomos da proteína NS4 do genoma do VHC revelou duas grandes regiões antigênicas (aminoácidos residuais 1691 a 1708 e 1710 a 1728) que se mostraram altamente variáveis entre os genótipos 1, 2 e 3 e cujos anticorpos tipo-específicos puderam ser detectados. Peptídeos tipo-específicos foram sintetizados e corresponderam a estas duas regiões e posteriormente foram empregados na técnica de ELISA indireto. Como mais genótipos foram descobertos, uma linha completa de peptídeos para os seis genótipos foi projetada e incluída no

ensaio, um total de 21 peptídeos.

Para a detecção dos anticorpos tipo-específicos e eventualmente para eliminação de reações cruzadas com peptídeos heterólogos, um ELISA de competição foi planejado. Amostras do soro foram incubadas junto a soluções bloqueadoras contendo peptídeos heterólogos, estes absorvidos numa reação cruzada. Uma linha de oito poços é usada para cada amostra testada, que inclui um poço positivo e um negativo como referência e seis poços para tipagem de cada amostra. Anteriormente aos soros uma solução bloqueadora de peptídeos heterólogos de competição é adicionada da seguinte forma para cada poço. Por exemplo: o poço para tipagem do VHC tipo 1 terá uma solução bloqueadora contendo peptídeos para os genótipos de 2 a 6, para o VHC tipo 2 estarão bloqueados os tipos 1, 3, 4, 5 e 6. A mesma lógica é seguida para todos os seis tipos em teste. Ao final, os anticorpos provenientes da amostra testada, só encontrarão disponíveis os peptídeos na fase sólida, que não se ligaram a nenhum dos peptídeos heterólogos de competição. Ao poço de referência positiva não foram adicionados peptídeos de competição, o que leva qualquer anticorpo anti-NS4 presente na amostra a fixar-se na fase sólida. Ao poço de referência negativa foram adicionados peptídeos de competição para os seis tipos, evitando-se desta forma a ligação de qualquer anticorpo anti-NS4. Na continuidade, uma reação de ELISA clássica acontece, como vamos descrever em seguida (96, 97, 98).

Reação de ELISA para sorotipagem do VHC

Cada amostra fez uso de uma linha de 8 poços de uma placa de ELISA.

1) Primeiramente 10µl das soluções bloqueadoras foram adicionadas, como mostra a Figura 2.

Figura 2 - Base para o ensaio de sorotipagem do VHC

| NB | TB | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | PEPTÍDIOS |
|----|----|---|---|---|---|---|---|-----------|
| U | U | U | U | U | U | U | U | |
| | | | | | | | | |
| ■ | □ | ■ | □ | □ | □ | □ | □ | 1 |
| ■ | □ | □ | ■ | □ | □ | □ | □ | 2 |
| ■ | □ | □ | □ | ■ | □ | □ | □ | 3 |
| ■ | □ | □ | □ | □ | ■ | □ | □ | 4 |
| ■ | □ | □ | □ | □ | □ | ■ | □ | 5 |
| ■ | □ | □ | □ | □ | □ | □ | ■ | 6 |

NB Não Bloqueado

TB Totalmente Bloqueado

■ peptídeo ausente na solução de competição

□ peptídeo presente na solução de competição

2) Acrescentado as amostras de soro a serem testadas na diluição de 1/20 e feita uma incubação a 37°C por 1 hora.

3) Feitas 4 lavagens com PBST, para eliminação das partículas de anticorpos e peptídeos de competição não fixados a fase sólida da placa.

4) Imediatamente após as lavagens, adicionado 100µl de solução de conjugado (anticorpos anti IgG humana HRP horsedish) na diluição de

1/20.000 com PBST 2% BSA e incubado a 37°C por 1 hora.

5) Feitas 4 lavagens com BPST, para eliminação do conjugado não fixado ao complexo Ag-Ac.

6) Imediatamente após as lavagens, acrescentado 100µl da solução de substrato (OPD) em cada poço e mantida a placa na temperatura de 37°C por trinta minutos, preferencialmente em ambiente escuro. Uma cor rosa desenvolveu-se nos poços que apresentaram amostras reativas.

7) Acrescentado 50µl de uma solução de Ácido Sulfúrico em cada poço a fim de interromper a reação num mesmo momento para todas as amostras.

8) Feita a leitura da absorbância a 450nm (A450) num prazo máximo de 15 minutos.

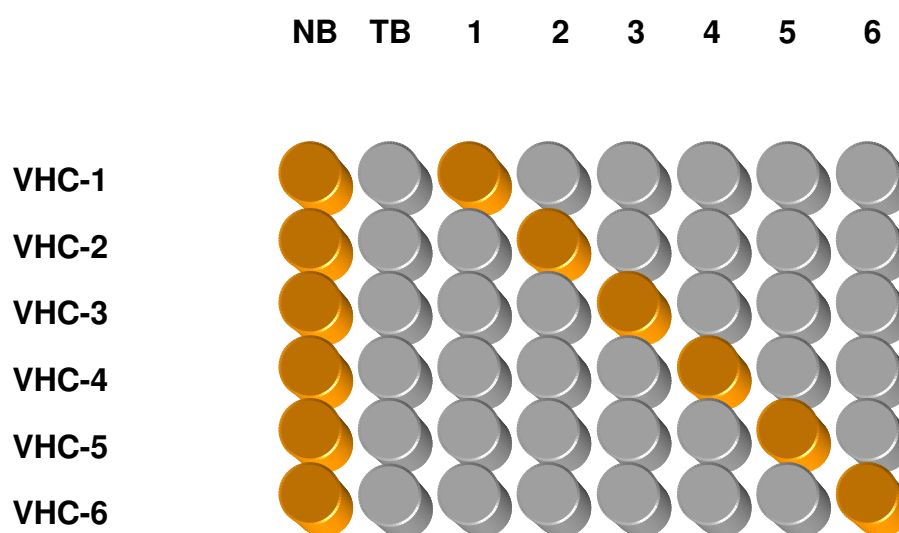
9) Interpretados os resultados*.

*** Interpretação dos resultados**

Muitas amostras podem ser interpretadas claramente apenas pela leitura visual, apresentando uma alta leitura da densidade ótica no poço não bloqueado (controle positivo) e também em um ou mais dos seis poços da mesma linha, no caso de múltipla infecção. O poço que foi completamente bloqueado deve apresentar-se negativo ou com baixa leitura de densidade ótica. As amostras que apresentaram baixas reatividades podem ser identificadas por uma comparação dos valores das D.O., porém estas amostras devem ser novamente testadas com uma concentração mais alta de soro (diluição 1:10) para confirmação do resultado.

A reação tipo-específica foi considerada significativa quando apresentou valores da DO superiores em duas vezes ou mais os valores da D.O. apresentado pelo poço de referência negativa (completamente bloqueado). Um esquema de resultados positivos para os tipos de 1 a 6 está representado na Figura 3.

Figura 3 - Resultados positivos de sorotipagem para tipos de 1 a 6 do VHC



NB-(controle positivo), poços não bloqueados, não foram adicionados os peptídeos de competição.

TB-(controle negativo), poços completamente bloqueados, foram adicionados peptídeos de competição para todos os tipos testados.

Controle de qualidade/Cálculo de resultado

1) Do valor da absorbância (A450) do poço não competidor (poço correspondente à linha H), portanto o controle positivo, deve ser subtraído o valor da absorbância do poço totalmente bloqueado (poço correspondente à linha G), ou controle negativo, e o resultado deve ser maior ou igual a 0,1.

2) Valor da absorbância (A450) do poço de maior leitura dividido pelo

valor da absorbância do poço não competidor (poço correspondente à linha H), deve ser maior ou igual a 0,4.

Os critérios 1 e 2 apresentam-se como condição necessária para validação do resultado positivo da amostra testada (96, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104).

Todas as amostras submetidas aos testes da PCR e sorotipagem foram manipuladas no Laboratório de Investigação Médica, LIM-47, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

6. ANÁLISE DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do protocolo padronizado foram digitados em planilha de Excel. A proporção de pacientes incluídos no estudo, cujos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) são menores ou iguais a 1,5 o limite superior normal, foi calculada como uma frequência simples, isto é, a razão entre o número de pacientes com nível normal de ALT ou até 1,5 vez o LSN e o número total de pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP, no período de 01/01/1997 a 30/04/2000.

Considerando-se o total de pacientes com infecção crônica pelo VHC com atividade de ALT com nível normal ou até 1,5 vez o LSN, atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP, no período de 01/01/1997 a 30/04/2000, calculou-se:

- a) a distribuição dos pacientes em relação ao gênero;
- b) a distribuição dos pacientes em relação à faixa etária;
- c) a distribuição dos pacientes quanto a alteração estrutural do tecido hepático, através de estudo anatomopatológico, considerando alteração leve 0-1 e alteração moderada ou intensa 2-4;

d) a distribuição dos pacientes quanto a alteração necroinflamatória do tecido hepático, através de estudo anatomopatológico, considerando atividade necroinflamatória leve 0-1 e 2-4 moderada ou intensa;

e) a distribuição dos pacientes em relação a esteatose;

f) a distribuição dos pacientes em relação aos genótipos do VHC.

7. RESULTADOS

Entre 1º de janeiro de 1997 a 30 de abril de 2000 foram matriculados 1688 pacientes no Ambulatório de Hepatites Virais do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, 492 pacientes tiveram diagnóstico de hepatite C crônica, destes 347 tinham hepatite C crônica e atividade de ALT elevada e 145 hepatite C crônica e ALT normal, foram considerados elegíveis 68 pacientes que tiveram diagnóstico de hepatite C crônica e ALT normal ou até 1,5 vezes o limite superior da normalidade, durante doze meses.

A prevalência de hepatite C crônica e ALT normal encontrada foi de 68/492 ou 13,82% (IC95%: 10,90%; 17,19%).

Dos 68 pacientes incluídos no estudo 4 evoluíram com elevação de ALT após período estudado.

Característica da população estudada segundo gênero e faixa etária.

Dentre os 68 pacientes incluídos no estudo 31 (45,6%) foram do gênero masculino e 37 (54,4%) do gênero feminino.

A distribuição dos pacientes em relação ao gênero é mostrada na Tabela 7.

Tabela 7- Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo gênero

| GÊNERO | Nº | (%) |
|------------------|-----------|------------|
| MASCULINO | 31 | 45,6 |
| FEMININO | 37 | 54,4 |
| TOTAL | 68 | 100,0 |

A idade variou dos 18 aos 71 anos, sendo que: 39,7% dos pacientes tinham de 18-30 anos; 26,5% dos pacientes tinham de 31-45 anos; 29,4% dos pacientes tinham de 46-60 anos e 4,4% dos pacientes tinham > 60 anos, tendo como média 38+/- 13 anos.

Na Tabela 8 é mostrada a distribuição quanto à faixa etária.

Tabela 8- Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo faixa etária

| IDADE (ANOS) | Nº | (%) |
|---------------------|-----------|------------|
| 18-30 | 27 | 39,7 |
| 31-45 | 18 | 26,5 |
| 46-60 | 20 | 29,4 |
| >60 | 3 | 4,4 |
| TOTAL | 68 | 100,0 |

CARACTERÍSTICA DA POPULAÇÃO ESTUDADA SEGUNDO AS CARACTERÍSTICAS ANATOMPATOLÓGICAS

Dos 79 pacientes incluídos no estudo, 72 pacientes foram submetidos à biópsia hepática, porém em 3 pacientes a amostra foi insuficiente e em 1 paciente a biópsia foi realizada em outro serviço e não pode ser revisada. Sete pacientes não foram submetidos à biópsia hepática.

Dentre os 68 pacientes, em que a biópsia hepática foi revisada, 26/68 (38,2%) apresentaram alteração estrutural grau 0, 32/68 (47,1%) apresentaram alteração estrutural grau 1, 7/68 (10,3%) apresentaram alteração estrutural grau 2, 3/68 (4,4%) apresentaram alteração estrutural grau 3.

Quanto ao infiltrado inflamatório portal nenhum paciente apresentou grau 0, 36/68 (52,9%) apresentaram infiltrado inflamatório portal grau 1, 26/68 (38,2%) apresentaram infiltrado inflamatório portal grau 2, 6/68 (8,8%) apresentaram infiltrado inflamatório portal grau 3 e nenhum paciente apresentou infiltrado inflamatório portal grau 4.

Quanto à distribuição da atividade periportal 36/68 (52,9%) apresentaram atividade periportal grau 0, 14/68 (20,6%) apresentaram atividade periportal grau 1, 13/68 (19,1%) apresentaram atividade periportal grau 2, 5/68 (8,8%) apresentaram atividade periportal grau 3 e nenhum paciente apresentou atividade periportal grau 4.

Quanto à distribuição da atividade parenquimatosa 3/68 (4,4%) apresentaram grau 0, 49/68 (72,0%) apresentaram atividade parenquimatosa grau 1, 15/68 (22,0%) apresentaram atividade

parenquimatosa grau 2, 1/68 (1,5%) apresentaram atividade parenquimatosa grau 3 e nenhum paciente apresentou atividade parenquimatosa grau 4.

A Tabela 9 mostra a distribuição dos pacientes em relação aos achados na biópsia hepática, segundo alteração arquitetural a atividade necro-inflamatória.

Tabela 9 - Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo as características anatomopatológicas

| | Nº | (%) |
|---------------------------------------|-----------|------------|
| <i>Alteração Arquitetural</i> | | |
| GRAU 0 | 26 | 38,2 |
| GRAU 1 | 32 | 47,1 |
| GRAU 2 | 7 | 10,3 |
| GRAU 3 | 3 | 4,4 |
| GRAU 4 | - | - |
| <i>Infiltrado Inflamatório Portal</i> | | |
| GRAU 0 | - | - |
| GRAU 1 | 36 | 52,9 |
| GRAU 2 | 26 | 38,2 |
| GRAU 3 | 6 | 8,8 |
| GRAU 4 | - | - |
| <i>Atividade Peri-portal</i> | | |
| GRAU 0 | 36 | 52,9 |
| GRAU 1 | 14 | 20,6 |
| GRAU 2 | 13 | 19,1 |
| GRAU 3 | 5 | 7,4 |
| GRAU 4 | - | - |
| <i>Atividade Parenquimatosa</i> | | |
| GRAU 0 | 3 | 4,4 |
| GRAU 1 | 49 | 72,0 |
| GRAU 2 | 15 | 22,0 |
| GRAU 3 | 1 | 1,5 |
| GRAU 4 | - | - |

Dos 68 pacientes em que houve revisão da biópsia, 73,5% apresentaram atividade peri-portal 0-1 e 26,5% atividade peri-portal 2-4. Quanto à atividade estrutural 85,3% apresentaram atividade 0-1 e 14,7% atividade 2-4.

A Tabela 10 mostra a distribuição dos pacientes quanto à atividade peri-portal.

A Tabela 11 mostra a distribuição quanto à atividade estrutural.

Tabela 10 - Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo a atividade peri-portal e atividade estrutural

| ATIVIDADE PERI-PORTAL | Nº | (%) |
|------------------------------|-----------|------------|
| 0-1 | 50 | 73,5 |
| 2-4 | 18 | 26,5 |
| TOTAL | 68 | 100 |

Tabela 11- Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo a atividade estrutural

| ATIVIDADE ESTRUTURAL | Nº | (%) |
|-----------------------------|-----------|------------|
| 0-1 | 58 | 85,3 |
| 2-4 | 10 | 14,7 |
| TOTAL | 68 | 100 |

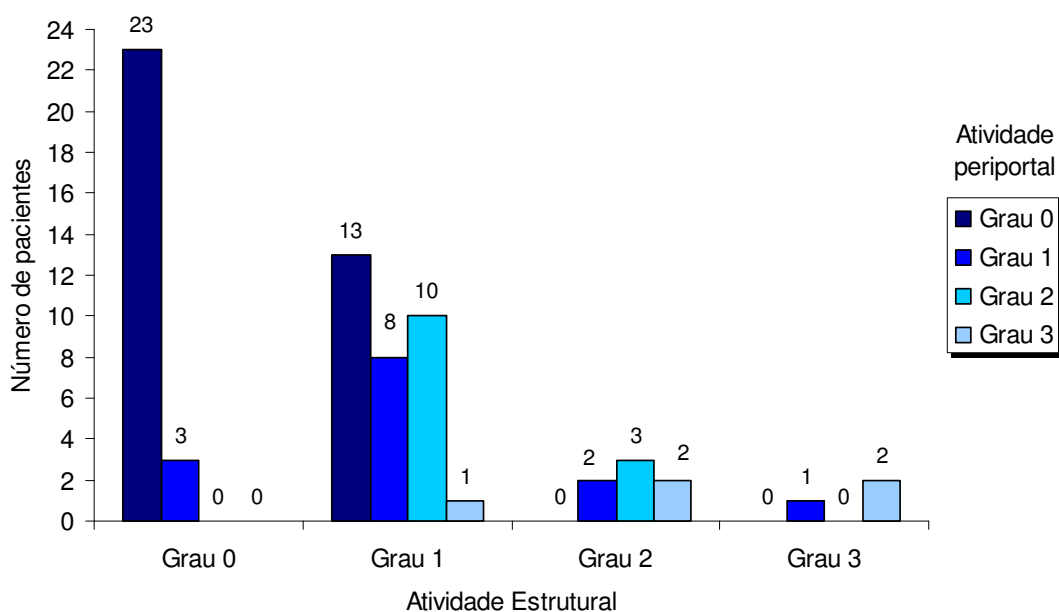
A Tabela 12 e Gráfico 1 representam a distribuição da atividade periportal e a atividade estrutural.

Tabela 12 - Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo atividade periportal e a atividade estrutural

| ATIVIDADE PERIportal | ATIVIDADE ESTRUTURAL | | | |
|----------------------|----------------------|--------|--------|--------|
| | Grau 0 | Grau 1 | Grau 2 | Grau 3 |
| GRAU 0 | 23 | 13 | 0 | 0 |
| GRAU 1 | 3 | 8 | 2 | 1 |
| GRAU 2 | 0 | 10 | 3 | 0 |
| GRAU 3 | 0 | 1 | 2 | 2 |
| TOTAL | 26 | 32 | 7 | 3 |

Dos 68 pacientes, 32 apresentaram hepatite crônica, sendo que: três apresentaram atividade periportal APP 1 e atividade estrutural AE zero, oito apresentaram APP 1 e AE 1, dois apresentaram APP 1 e AE 2, um apresentou APP1 e AE 3, dez apresentaram APP 2 e AE 1, três apresentaram APP 2 e AE 2, um apresentou APP 3 e AE 1, dois apresentaram APP3 e AE 2, dois apresentaram APP 3 e AE 3, nenhum paciente apresentou cirrose.

Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo a atividade periportal e a atividade estrutural



Dos 68 pacientes os quais a biópsia hepática foi revisada 18/68 (26,5%) apresentaram esteatose hepática, 17 tinham esteatose grau 1 e 1 paciente esteatose grau 2. 50/68 (73,5%) não apresentaram esteatose hepática.

A Tabela 13 mostra a distribuição dos pacientes quanto a esteatose.

Tabela 13- Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo a esteatose

| ESTEATOSE | Nº | (%) |
|--------------|-----|-------|
| SIM | 18* | 26,5 |
| NÃO | 50 | 73,5 |
| TOTAL | 68 | 100,0 |

*Apenas 1 paciente apresentou esteatose grau 2.

CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA QUANTO A GENOTIPAGEM

Dos 68 pacientes, foi possível realizar a genotipagem de 59 pacientes, com material que se encontrava estocado no LIM-47.

Destes 59, 50 pacientes apresentaram o genótipo 1, sendo que 7 apresentaram o genótipo 1; 17 o subtipo 1a; 25 o subtipo 1b; e 1 subtipo misto 1a/1b.

Quatro pacientes apresentaram o genótipo 2; um o genótipo 2; e 3 o subtipo 2b.

Cinco pacientes apresentaram o genótipo 3a.

A Tabela 14 mostra a distribuição dos pacientes em relação ao genótipo.

Tabela 14- Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT segundo genotipagem

| GENÓTIPO | Nº | (%) |
|-----------------|-----------|--------------|
| 1 | 7 | 11,86 |
| 1a | 17 | 28,82 |
| 1b | 25 | 42,37 |
| 1a/1b | 1 | 1,70 |
| 2 | 1 | 1,70 |
| 2b | 3 | 5,08 |
| 3a | 5 | 8,47 |
| TOTAL | 59 | 100,0 |

8. DISCUSSÃO

Por meio deste estudo foi possível estimar a prevalência de pacientes com hepatite C crônica e transaminases normais, que foi de 13,82%, no Ambulatório de Hepatites Virais da Divisão de Moléstias Infeciosas e Parasitárias.

Foram incluídos todos os pacientes com ALT normal ou até 1,5 vez o LSN, que foram submetidos a biópsia hepática. Entretanto, não foram incluídos os pacientes com apenas uma dosagem de ALT anual, o que provavelmente subestimou a prevalência encontrada.

De acordo com a literatura, a prevalência de hepatite C com ALT normal varia de 7,5% a 46% (2, 25, 27, 31, 33, 34, 35).

A variação da prevalência deste trabalho em relação à literatura mundial deve-se à inclusão de pacientes com ALT estritamente normal com os com ALT próximo do normal, conforme a tabela abaixo.

| Autor | Prevalência |
|--------------------|--------------------|
| Tassapoulos N. C. | 25 |
| Mathurim P. et al. | 7,5 |
| Persico M. et al. | 9,2 - 10,7 |
| Marcellin P. et al | 25 |
| Alberti A. et al. | 46 |
| Pradat P. et al. | 8 |
| Paraná R. et al. | 17,6 |

Variação no número de valores de ALT obtidos e ausência de dados a respeito do consumo de álcool.

Nesta casuística foram incluídos pacientes com ALT normal e com ALT até 1,5 vez o LSN. Para seleção, foi usado o critério de Puoti et al., que classifica os pacientes em dois grupos: os bioquimicamente silenciosos, que se mantêm com ALT estritamente normal e os que apresentam leve elevação dos níveis de ALT (18). Foram adotados, no mínimo, três dosagens de ALT, uma vez utilizada a média de seguimento dos pacientes que retornam ao ambulatório.

O período de seguimento foi de 12 meses. Estudos recentes vêm mostrando que 30% a 50% dos pacientes que se encontram inicialmente no critério proposto pelo NIH (38) têm evoluído com aumento de ALT, quando o período de observação se estende por mais de seis meses (22, 57).

Nesta série, foram encontrados 54,4% de gênero feminino e 45,6% de masculino. Diversos estudos indicam prevalência de mulheres nessa população (21, 22, 23, 105), predominância essa que sugere um possível efeito protetor dos estrógenos que pode bloquear a proliferação de células estelares e fibrinogênese (106). É também possível que, em razão das diferenças no estilo de vida entre os gêneros, notadamente em relação ao consumo de álcool, reconhecidamente um fator de evolução de doença, as mulheres apresentem a doença histologicamente mais leve (106).

Este estudo encontrou uma faixa etária compreendida entre 18 e 71 anos, cuja média foi de 38 +/- 13 anos, que corresponde ao esperado, de acordo com Alter et al. e Foccacia et al. (5, 30).

Em relação aos genótipos do VHC, ressaltamos que o método de sequenciamento utilizado para o diagnóstico dos tipos virais do VHC (Bayer Health Care Diagnostics) está disponível no mercado apenas para fins de pesquisa e a avaliação e comparação das seqüências genômicas conta com uma biblioteca selecionada e atualizada em software disponibilizado pela empresa. Foi encontrado um predomínio do genótipo 1, em 84,75% dos nossos pacientes, seguido do genótipo 3, em 8,47%, e do genótipo 2, em 6,78% deles, predomínios, aliás, semelhante aos descritos por Cavalheiro et al. e Bassit et al., que, por sua vez, não discriminam o nível de ALT (10, 51).

A distribuição dos genótipos encontrada neste estudo é similar à encontrada na Europa, onde os genótipos mais prevalentes são 1 e 3 e cuja disseminação, provavelmente, ocorreu mediante transfusão de sangue.

Recentemente foi publicada a distribuição geográfica dos genótipos em diversas regiões brasileiras. Os autores examinaram 1.688 amostras das quais foram encontrados predomínios do genótipo 1, em 64,9% delas (1095), do genótipo 2 em 4,6% (78), do genótipo 3 em 30,2% (510), do genótipo 4 em 0,2% (3) e do genótipo 5 em 0,1% (2). A freqüência dos genótipos do VHC, por sua vez, foi estatisticamente diferente entre as regiões brasileiras ($p=0,00017$). Em todas elas, o genótipo 1 foi o mais freqüente (51,7% a 74,1%), seguido do genótipo 3 e 2, em concordância com a nossa amostragem.

Na região Norte houve predomínio do genótipo 1, na região Centro-oeste do genótipo 2 (11,4%), especialmente no estado do Mato Grosso, ao passo que o genótipo 3 foi mais encontrado no Sul do país (43,2%). Os

genótipos 4 e 5, raramente encontrados, são do Sudeste, no estado de São Paulo (107).

Para nove pacientes foi utilizada a técnica de sorotipagem, diagnóstico do tipo do VHC por método imunoenzimático ELISA, pois apesar de pelo menos em um momento estes pacientes apresentarem resultado positivo para a PCR-HCV, na procura retrospectiva de amostras somente tínhamos disponíveis as de resultado negativo para a detecção do genoma do VHC.

De acordo com relatos, a infecção crônica pelo VHC causada pelo genótipo 1b associa-se a doença hepática mais severa. Entretanto, o papel do genótipo no resultado da lesão hepática é controverso, uma vez que os pacientes infectados com genótipo 1b são mais velhos. Nesta série ocorreu predomínio do genótipo 1b e a maioria dos casos apresentou lesão histológica leve.

Puoti et al. compararam um grupo de pacientes com ALT elevada com outro com ALT normal e não encontraram associação em ambos os grupos entre genótipo do VHC e grau de lesão hepática, argumento que pode ser usado contra o valor preditivo do genótipo (18).

Foi encontrado 1 paciente com infecção mista (genótipo 1a/1b). Sabe-se que a infecção por um genótipo do VHC não confere imunidade protetora a outro genótipo, razão pela qual permitem-se múltiplas infecções pelo VHC num mesmo indivíduo, algumas vezes resultado de infecções por subtipos mistos, como as encontradas nesta análise (12).

De acordo com o relato de Prati D. et al. (59), essa ocorrência é variável em menos de 5% dos pacientes. Toyoda H. et al. (60), por sua vez, observam-na em 22,5% de uma população portadora de coagulopatia.

Essa possibilidade de mais de um genótipo de HCV persistir num mesmo indivíduo tem sido descrita em primatas e humanos, especialmente em pacientes com risco evidente de múltipla exposição de infecção - usuários de drogas endovenosas, hemofílicos (108) e pacientes submetidos a hemodiálise. No entanto, a infecção também pode ocorrer em pacientes sem nenhum fator de risco particular (109).

Uma outra limitação deste estudo é o desconhecimento dos fatores de risco de aquisição de VHC.

Embora tenha sido dado um grande passo no conhecimento da progressão da doença, fatores que a afetam bem como ao desenvolvimento de cirrose permanecem controversos; 20%-30% de pacientes com infecção com VHC evoluem para cirrose, o que sugere que, além do vírus, outros fatores levam a fibrogênese, tais como, gênero - a taxa de progressão é mais rápida em homens (0,15 unidades/ano) que em mulheres (0,11 unidades/ano) (26); idade de infecção - a taxa de progressão é mais rápida em pacientes acima de 50 anos (0,33 unidades/ano) X pacientes abaixo dos 20 anos (0,09 unidades/ano) (26); genótipo - pacientes infectados com genótipo 1 têm lesão histológica mais severa (110); álcool - consumo diário > 50g (26); e co-infecção HIV-HCV - mais risco de evolução para cirrose, cujos preditores de fibrose severa são idade maior que 35 anos, consumo de

álcool e $CD4+ < 550 \text{ cé}/\text{mm}^3$ (111,112), são implicados no desenvolvimento da cirrose.

A esteatose também tem aparecido como um achado histológico de progressão de fibrose e se constitui uma característica comum da hepatite C crônica.

Estudos prévios têm também elucidado alguns aspectos de relação entre esteatose e VHC, dentre eles, particularmente elevado IMC e níveis elevados de triglicérides (113). Nesta casuística, não se obtiveram dados referentes a IMC, triglicérides e glicemia, uma vez que se trata de estudo retrospectivo, cujas características, como peso, altura, dosagem de triglicérides, não se encontravam descritas no prontuário.

Estudos transversais sugerem de que a esteatose hepática possa ser decorrente de um efeito citopático do vírus C, especialmente em pacientes infectados com genótipo 3.

Kumar et al. constataram isso mediante análise da gravidade da esteatose em 28 pacientes com genótipo 1 e em 34 com genótipo 3, pré e pós-tratamento. Antes do tratamento, a esteatose hepática estava presente em 16 deles (57%) infectados com genótipo 1, e em 21 (62%), com genótipo 3. Resposta virológica sustentada (RSV) foi obtida em 9 (32%) pacientes com genótipo 1 e em 22 (65%), com genótipo 3. Nos pacientes com genótipo 1 não houve mudança na esteatose após o tratamento, independentemente da resposta ao tratamento. Entre os pacientes com genótipo 3, a RVS significativa reduziu a esteatose ($p < 0,001$), mas não houve mudança na

esteatose entre os sem RSV. Esses dados suportam associação causal entre genótipo 3 e esteatose hepática (113).

Adinolfi et al. constataram que os infectados com genótipo 3a (14%) apresentavam maior prevalência de esteatose que os infectados com outros genótipos (genótipo 3a (77%) X genótipo 1 (36%) $p < 0,001$, genótipo 2a (57%), $p < 0,03$). Aqueles pacientes com esteatose grau 3-4 também mostraram um IAH (índice de atividade histológica) maior que os sem esteatose IAH $6.24 \pm 0,56$ versus $4,69 \pm 0,30$, respectivamente $p < 0,005$ (114).

A freqüência de esteatose dos pacientes com hepatite C é de aproximadamente 30% a 70% (114).

Em 26,5% dos nossos pacientes foi encontrada esteatose, dos quais apenas um teve esteatose grau II; em 73,5%, ausência de esteatose; e em 8,47%, infecção pelo genótipo 3, fatores que levam à hipótese de evolução menor de fibrose nessa população.

De acordo com estudos prévios, os dados deste trabalho mostram que a presença de RNA do VHC é associada a lesão hepática, mesmo com atividade normal de ALT, o que sugere a revisão da definição de hepatite crônica atualmente baseada em testes bioquímicos hepáticos anormais, uma vez que lesão hepática é freqüentemente encontrada em pacientes com ALT normal. Nessa série encontraram-se 52,9% dos pacientes com fígado reacional, achado que, segundo a Sociedade Brasileira de Patologia, revela lesões relativamente menores que as conceituadas como hepatites, mas, mesmo assim, diferindo da normalidade, em razão da ação agressiva

mínima do vírus ou da resposta inespecífica hepática em face de outros processos sistêmicos (73).

O espectro da lesão hepática observado em pacientes com hepatite C crônica e ALT normal é variável, mas há consenso na literatura de que, na maioria dos casos, a lesão histológica é leve. Os dados deste trabalho são semelhantes aos descritos na literatura (22, 33, 83): 85,3% dos pacientes com atividade periportal de 0 a 1, 14,7% dos pacientes com atividade periportal de 2 a 4, 73,5% dos pacientes com atividade estrutural de 0 a 1, e 26,5% dos pacientes com atividade estrutural de 2 a 4.

Foram utilizadas essas duas variáveis porque as hepatites crônicas caracterizam-se por dois tipos de lesão principais: atividade necroinflamatória e fibrose. A atividade necroinflamatória é flutuante e indica a intensidade da necrose no momento em que foi realizada a biópsia; e a fibrose é uma conseqüência da extensão e manutenção da atividade necroinflamatória. A fibrose é resultado da agressão ao fígado, que altera a estrutura hepática e leva a cirrose.

Há estudos indicando que pacientes com hepatite C crônica com nível de ALT normal e que tem significativa atividade e/ou fibrose tem risco de progressão, razão por que podem desenvolver complicações de acordo com o aumento dessa atividade e da fibrose. Hui et al. descrevem a taxa de progressão histológica, na biópsia inicial, em 27 pacientes com F0 (15 com ALT normal e 12 com ALT elevada) e em 34 com F1 (16 com ALT normal e 18 com ALT elevada). Os pacientes foram submetidos a uma segunda biópsia após um período médio de 6,3 anos. A progressão de fibrose foi

vista em 22,5% dos pacientes com ALT normal e em 43% com ALT elevada, e a fibrose severa foi observada em 20% dos pacientes com ALT elevada (115).

Nossos dados reforçam os da literatura, segundo a qual, embora ocorra fibrose, ela é menor que em pacientes com ALT elevada, em razão, possivelmente, da correlação entre intensidade necroinflamatória e progressão da fibrose nessa população, e que as lesões histológicas sejam mais leves de acordo com relato recente de Fontaine et al. (116).

Yano et al. estudaram 70 pacientes com VHC, com 2 a 10 biópsias hepáticas (média de 3,9), obtidas num intervalo de 1 a 26 anos (média 8,8 anos). Trinta e cinco pacientes (50%) desenvolveram cirrose, que ocorreu em todos os pacientes com alto grau de necroinflamação na biópsia inicial, seguidos com intervalo de 10 anos e em 96% dos pacientes com grau intermediário (3,5% a 4,9%), que foram acompanhados por 17 anos (91).

Hepatite C crônica é uma doença classificada em leve, moderada e severa, de acordo com a histologia hepática. A respeito do estágio de fibrose, a hepatite C crônica leve é caracterizada pela ausência de fibrose ou pela fibrose mínima, limitada ao espaço portal, estágio que corresponde à graduação E0-E1; em relação à atividade periportal, caracteriza-se pela ausência ou discreta necrose em saca-bocado, que corresponde à graduação APP 1-2.

A hepatite C crônica moderada a atividade periportal, caracteriza-se pela presença de necrose em saca-bocado moderada e por fibrose portal com septos porta-porta, estágio APP3 e E2. A hepatite C crônica severa, por

sua vez, em estágio pré-cirrótico, revela preservação apenas parcial da arquitetura lobular, com septos porta-porta e porta-centro, com esboço de nódulos e necrose em saca-bocado extensa E3 e APP3. Tratar-se-á de cirrose se houver predomínio de áreas nodulares E4. De acordo com o consenso mundial, a hepatite moderada a severa ou cirrose compensada deve ser tratada e os critérios vigentes da portaria do Ministério da Saúde em 2002 (117), também sugerem tratamento em pacientes com APP>2 e/ou E>1.

Com base nestas indicações 29% dos nossos pacientes, têm indicação de tratamento antiviral, reforçando que a realização da biópsia independente de nível de ALT, deve ser útil para tranquilizar pacientes com lesão mínima, que constituem a maioria nesta população, identificar casos com lesão hepática mais severa e selecionar pacientes para tratamento.

9. CONCLUSÃO

1. A prevalência de pacientes com hepatite C crônica e atividade normal de ALT em um ambulatório especializado no atendimento de pacientes com hepatites virais foi de 13,82%.
2. Encontramos predomínio do genótipo 1 nesta população.
3. Fígado reacional foi encontrado na maioria das biópsias (52,9%). Houve predomínio de baixo grau de atividade e fibrose e aproximadamente 1/3 dos pacientes têm indicação de tratamento antiviral.
4. Não houve predomínio do gênero feminino nesta casuística.

10. ANEXO

CARACTERÍSTICAS DE PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA E TRANSAMINASES NORMAIS

- 1- NOME | _____ |
- 2- RG | _____ |
- 3- Data de nascimento | _____ |
- 4- Gênero | ____ |
- 5- Sorologia VHC | _____ | DO/CO | _____ |
- 6- PCR QUANTITATIVO | _____ |
 QUALITATIVO | _____ |
- 7- Genótipo | _____ |
- 8- Biópsia hepática número | _____ |
 data | _____ |
 Atividade estrutural | _____ |
 Infiltrado inflamatório portal | _____ |
 Infiltrado inflamatório periportal | _____ |
 Atividade parequimatosa | _____ |
 Marcadores etiológicos | _____ |
 Pigmentos | _____ |
- 9- Dosagem de ALT
- ALT _____ Data _____
- ALT _____ Data _____
- ALT _____ Data _____

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989 Apr 21;244(4902):359-62.
2. Tassopoulos NC. Treatment of patients with chronic hepatitis C and normal ALT levels. *J Hepatol*. 1999;31(1):193-6.
3. Brillanti S, Folli M, Gaiani S, Masci C, Miglioli M, Barbara L. Persistent hepatitis C viraemia without liver disease. *Lancet*. 1993 Feb 20;341(8843):464-5.
4. Riestra S, Fernandez E, Leiva P, Garcia S, Ocio G, Rodrigo L. Prevalence of hepatitis C virus infection in the general population of northern Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001 May;13(5):477-81.
5. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med*. 1999 Aug 19;341(8):556-62.

6. National Institutes of Health. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C: 2002-June 10-12, 2002. *Hepatology*. 2002 Nov;36(Suppl1):S3-20.
7. Alter MJ, Mast EE. The epidemiology of viral hepatitis in the United States. *Gastroenterol Clin North Am*. 1994 Sep;23(3):437-55.
8. McHutchison J. Hepatitis C therapy in treatment-naive patients. *Am J Med*. 1999 Dec 27;107(6B):56S-61S.
9. Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology*. 1997 Jun;25(6):1527-38.
10. Cavalheiro NP, Barone AA, Tengan FM. HCV serotypes in Brazilian patients. *Int J Infect Dis*. 2002 Sep;6(3):228-32.
11. Davis GL. Hepatitis C. In: Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC, editors. Schiff's diseases of the liver 8.ed. Philadelphia, Lippincott-Raven, v.1; 1999;p.793-836.
12. Kao JIA-Horng, Chen Pei-Jer, Lai Ming-Yang and Chen Ding-Shinn. Superinfection of heterologous Hepatitis C virus in a patient with chronic type C hepatitis. *Gastroenterology*. 1993;105:583-7.

13. Gayotto Luiz Carlos da Costa, Alves Venâncio Avancini Ferreira Alves. *Doenças do fígado e vias biliares*. São Paulo: Atheneu; 2001.
14. Hoofnagle JH. Hepatitis C: The clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997;26(3):15S-20S.
15. Vento S, Garofano T, Renzini C, Cainelli F, Casali F, Ghironzi G, Ferraro T and Concia E. Fulminant Hepatitis associated with hepatitis A virus superinfection in patients with chronic Hepatitis C. *N Engl J Med*. 1998;338(5):286-90.
16. Tremolada F, Casarin C, Alberti A, Drago C, Tagger A, Ribero ML and Realdi G. Long-term follow-up of non-a, non-B (type C) post-transfusion hepatitis. *J Hepatol*. 1992;16:273-81.
17. Kenny Wash Elizabeth. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. *N Engl J Med*. 1999;340:1228-33.
18. Puotti C, Magrini A, Stati T, Rigato P, Montagnese F, Rossi P, Aldegheri L and Resta S. Clinical, histological and virological features of hepatitis C virus carriers with persistently normal or abnormal alanine transaminase levels. *Hepatology*. 1997;26(6):1393-8.

19. Recommendations for Prevention and Control of Hepatitis C Virus (HCV) Infection and HCV-Related Chronic Disease. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 1998;47(RR19):1-33.
20. Jamal MM, Soni A, Quinn PG, Wheeler DE, Arora S and Johnston DE. Clinical features of Hepatitis C-Infected patients with persistently normal alanine transaminase levels in the Southwestern United States. *Hepatology*. 1999;30(5):1307-11.
21. Shakil M, Conry-Cantilena C, Alter HJ, Hayashi P, Kleiner DE, Tedeschi V, Krawczynski K et al. Volunteer blood with antibody to hepatitis C virus: clinical, biochemical, virologic and histologic features. *Ann Intern Med*. 1995;123:330-7.
22. Puoti C, Castellacci R, Montagnese F, Zaltron S, Stornaiuolo G, Bergami N, Bellis L, Precone DF, Corvisieri P, Puoti M, Minola E, Gaeta GB. Histological and virological features and follow-up of hepatitis C virus carriers with normal aminotransferase levels: the Italian prospective study of the asymptomatic C carriers (ISACC). *J Hepatol*. 2002;37:117-23.
23. Shindo M, Arai K, Sokawa Y and Okuno T. The virological and histological states of anti-Hepatitis C Virus - positive subjects with normal liver biochemical values. *Hepatology*. 1995;22(20):418-25.

24. Hervé S, Savoye G, Riachi G, Hellot MF, Gorla O, Leberurs E, Colin R and Ducrotte P. Chronic hepatitis C with normal or abnormal aminotransferase levels: is it the same entity? *Euro J Gastroenterol Hepatol.* 2001;13(5):495-500.
25. Mathurin P, Moussalli J, Cadranel JF, Thibault V, Charlotte F, Dumouchel P, Cazier A, Huraux JM, Devergie B, Vidaud M, Opolon P and Poynard T. Slow progression rate of fibrosis in Hepatitis C virus patients with persistently normal alanine transaminase activity. *Hepatology* 1998;27(3): 868-72.
26. Poynard T, Bedossa P and Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *The Lancet.* 1997;349:825-32.
27. Persico M, Persico E, Suozzo R, Salvatore C, Seta M, Coppola L, Palmentieri B, Sasso FC and Torella R. Natural history of Hepatitis C virus Carriers with persistently normal aminotransferase levels. *Gastroenterology.* 2000;118:760-4.
28. El-Sareg HG, Hampel H, Yeh C, Rabeneck L. Extrahepatic manifestations of hepatitis C among United States male veterans. *Hepatology.* 2002;36(6):1439-45.

29. Frank C, Mohamed MK, Strickland GT et al. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*. 2000;355:887-91.
30. Foccacia R, da Conceição OJ, Sette H Jr, Sabino E, Bassit L, Nitrini DR, Lomar AV, Lorenço R, Vieira de Souza F, Kiffer CR, Santos EB, Gonzalez MP, Sáez-Alquézar A, Riscal JR and Fischer D. Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence- based population. *Braz J Infect Dis*. 1998, v.2-269-84.
31. Marcellin P, Lévy S and Erlinger S. Therapy of hepatitis C: patients with normal aminotransferase levels. *Hepatology* 1997;26(3):133-6.
32. Conry-Cantilena C, VanRaden M, Gibble J, Melpolder J, Viladomiu L, Cheung L, DiBisceglie A, Hoofnagle J, Shih JW, Kaslow R, Ness P, Alter HJ. Routes of Infection, viremia and liver disease in blood donors found to have Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 1996;334(26):1691-6.
33. Alberti A, Noventa F, Benvegnú L, Boccato S and Gatt A. Prevalence of liver disease in a population of asymptomatic persons with Hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med*. 2002;137(12):961-4.

34. Pradat P, Alberti A, Poynard T, Esteban JI, Weiland O, Marcellin P, Bandalamenti S and Trépo C. Predictive value of ALT levels for histologic findings in chronic Hepatitis C: A European Collaborative Study. *Hepatology* 2002;36(4):973-7.
35. Paraná R, Vitvitski L, Berby F, Portugal M, Cotrim HP, Cavalcante A, Lyra L and Trépo C. HCV Infection in Northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3^a and absence of African genotypes. *Arq Gastroenterol.* 2000;37(4):213-6.
36. Cavalheiro NP. Hepatite C: transmissão entre casais (tese). São Paulo, Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo;2004.
37. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2001;345:41-52.
38. NIH Consensus Statement. Management of Hepatitis C. *National Institutes of Health* 1997;15-1-41.
39. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2003;52 (RR03):1-16.

40. Foccacia Roberto. *Tratado de Hepatites Virais*. São Paulo: Atheneu; 2003.
41. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994;19:1321-4.
42. Davis GL. Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Am J Med*. 1999;107(6B):p21s-26s.
43. McOmish F, Yap PL, Dow BC, Follett EAC, Seed C, Keller AJ, Cobain TJ, Krusius T, Kolho E, Naukkarinen R, Lin C, Lai C, Leong S, Medgyesi G A, Héjjas M, Kiyokawa R, Fukada K, Cuypers T, Saeed AA, Al-Rasheed AM, Lin M and Simmonds P. Geographical distribution of Hepatitis C virus genotypes in blood donors: na International Collaborative Survey. *J Clin Microbiol*. 1994; 32 (4):884-92.
44. Manahey K, Tedeshi V, Maertens G, Di Bisceglie AM, Vergalla J, Hoofnagle JH and Sallie R. Genotypic analysis of hepatitis C virus in americam patients. *Hepatology* 1994 ;20(6):1405-11.

45. Pawlostsky JM, Tsakiris L, Thoraval FR, Pellet C, Stuyver L, Duval J and Dhumeaux D. Relationship between Hepatitis C virus genotypes and source of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis.* 1995;171:1607-10.
46. Bassit L, Silva LC, Santos Gabriela R, Maertens G, Carrilho FJ, Fonseca LEP, Alves VAF, Gayotto LCC, Pereira AN, Takei K, Chamone D and Sáez-Alquézar A. Chronic Hepatitis C virus infections in Brazilian patients: association with genotypes, clinical parameters and response to long term alpha interferon therapy. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 1999;41(3):183-9.
47. Martins RMB, Vanderborcht BOM, Yoshida CFT. Hepatitis C virus genotypes among blood donors from different regions of Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93(3):299-300.
48. Silva LK, Paraná R, Souza SP, Berby F, Kay A, Trego C, Santana N, Cotrim HP, Lyra L and Reis MG. Hepatitis C virus in a northeastern area of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;v.62(2):257-60.
49. Stroffolini T, Fiume A, Fatale G, Regni F, Ciccozzi M, Marzolini A and Mele A. Hepatitis C virus genotypes among intravenous drug users in Italy. *Hepatol Res.* 1997;9(1):20-7.

50. Krug LP, Lunge VR, Ikuta N, Fonseca ASK, Cheinquer H, Ozaki LS and Barros SGS. Hepatitis C virus genotypes in Southern Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 1996;29:1629-32.
51. Bassit LM, Santos GR, Silva LC, Takei K, Villaça P, Neto David E, Chamone D and Alquézar AS. Genotype distribution of hepatitis C virus in São Paulo, Brazil: rare subtype found. *Hepatology* 1999;v.29(3):994-5.
52. Levi EJ, Takaoka DT, Garrini RH, Fachini RM, Foccacia R, Santos EB, Mitre HP, Mendonça JS, Cavalheiro NP, Barone AA, Wendel S. Three cases of infection with hepatitis C virus genotype 5 among Brazilian Hepatitis Patients. *J Clin Microbiol.* 2002;40(7)-2645-7.
53. Rossini A, Ravaggi A, Agostinelli E, Bercich L, Gazzola GB, Radaeli E, Francesco C and Cariani E. Virological characterization and liver histology in HCV positive subjects with normal and elevated ALT levels. *Liver* 1997; 17(3):133-8.
54. Silini E, Bono F, Cividini A, Cerino A, Bruno S, Rossi S, Belloni G, Brugnetti B, Civardi E, Salvaneschi L and Mondelli M. Differential distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with and without liver function abnormalities. *Hepatology* 1995;21:285-90.

55. Morisco F, Del Vecchio Blanco G, Tuccillo C, Galli C, Cirini S and Caporaso N. Long term observation of HCV-positive patients with normal ALT values: persistence of a clinically healthy state. *Res Virol.* 1998;149:277-82.
56. Hervé Z, Pol S, Thiers V, Chaix ML, Largoce DB, Bréchet C, Nalpas B and Berthelot P. Significance of repeatedly normal aminotransferase activities in HCV-Infected Patients. *J Clin Gastroenterol.* 1999;29(1):71-5.
57. Martinot-Peignoux M, Boyer N, Cazals-Hatem D, Pham B, Gervais A, Le Breton V, Levy S, Degott C, Valla DC and Marcellin P. Prospective study on anti-hepatitis virus-positive patients with persistently normal serum alanine transaminase with or without detectable serum hepatitis C virus RNA. *Hepatology* 2001;34(5):1000-5.
58. Dinçer D, Ökten A, Kaymakoglu S, Besisik F, Demir K, Tuncer I, Bozaci M, Turkoglu S, Cevikbas U and Cakaloglu Y. Persistently normal alanine transaminase levels in chronic C hepatitis: what does it tell us? *Hepatogastroenterology* 2001;48:139-1400.
59. Prati D, Capelli C, Zanella FM, Bosoni P et al. Influence of different hepatitis C virus genotypes on the course of asymptomatic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1996;110:178-83.

60. Toyoda H, Fukuda Y, Hayakawa T, Kumada T, Nakano S, Takamatsu J and Saito H. Characteristics of patients with chronic infection due hepatitis C virus of mixed subtype: prevalence, viral RNA concentrations, and response to interferon therapy. *Clin Infect Dis*. 1998;26:440-5.
61. Pratt DS and Kaplan MM. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *N Engl J Med*. 2000;342(17):1266-71.
62. Roching Fedja A. Evaluation of abnormal liver tests. *Clin Cornerstone*. 2001;3(6):1-12.
63. Parolin MB and Reason IJM. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arquivos de Gastroenterologia*. 2001;38(2):138-44.
64. Alberti A, Morsica G, Chemello L, Cavalleto D, Novente F, Pontisso P and Ruol A. Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *The Lancet*. 1992;340:697-8.

65. Esteban JI, Lopez-Talavera JC, Genesca J, Madoz P, Viladomiu L, Muniz E, Martin V, Rossell M, Allende H, Vidal X, González A, Hernández JM, Esteban R and Guardia J. High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. *Ann Int Med.* 1991;115:443-4.
66. Piton A, Poynard T, Imbert-Bismut F, Khalil L, Delattre J, Pelissier E, Sansonetti N and Opolon P. Factors associated with serum alanine transaminase activity in healthy subjects: consequences for the definition of normal values, for selection of blood donors, and for patients with chronic Hepatitis C. *Hepatology* 1998;27(5):1213-9.
67. Prati D, Taioli E, Zanella A, Della Torre E, Butelli S, Del Vecchio E, Vianello L, Zanuso F, Mozzi F, Milani S, Conte D, Colombo M, Girolamo S. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann Int Med.* 2002;137(1):1-10.
68. Aach RD, Szmunes W, Mosley JW, Hollinger FB, Kahn RA, Stevens CE, Edwards VM, Werch J. Serum alanine aminotransferase of donors in relation to the risk of non-A,non-B hepatitis in recipients: the transfusion-transmitted viruses study. *N Engl J Med.* 1981 Apr 23;304(17):989-94.

69. NIH Consensus Development Panel on Infectious Diseases Testing for Blood Transfusions. *JAMA*. 1995;274(17):1374-9.
70. Cable R, Badon S, Pray C and Popovsky MA. Limited utility of alanine aminotransferase screenig of hepatitis C antibody-screened blood donors. *Transfusion*. 1997;37:206-10.
71. Gordon, SC, Fang JWS, Silverman AL, McHutchison and Albrecht JK. The significance of baseline serum alanine aminotransferase on pretreatment disease characterisics and response to antiviral therapy in chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 2000;32(2):400-4.
72. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med*. 2001;344(7):495-500.
73. Gayotto Luiz Carlos da Costa Gayotto e Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. *GED* 2000;19(3):137-40.
74. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW and Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*. 1981;4:431-5.

75. Hübscher SG. Histological grading and staging in chronic hepatitis: clinical applications and problems. *J Hepatol.* 1998;29:1015-22.
76. Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, Di Martino V, Bedossa P, Opolon P. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis.* 2000;20(1):47-55. Review.
77. Bedossa, P Poynard T. Na algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1996;24:289-93.
78. Kronenberger B, Rüster B, Lee JH, Sarrazin C, Roth WK, Günter H and Zeuzem S. Hepatocellular proliferation in patients with chronic hepatitis C and persistently normal or abnormal aminotransferase levels. *J Hepatol.* 2000;33(4):640-7.
79. Ahmed A and Keeffe EB. Chronic Hepatitis C with normal aminotransferase levels. *Gastroenterology.* 2004;126:1409-15.
80. Saadeh S, Cammell G, Carey WD, Younossi Z, Barnes D and Easley K. The role of liver biopsy in chronic Hepatitis C. *Hepatology.* 2001;33(1):196-200.
81. Nutt AK, Hassan AH, Lindsey JRNP, Lamps LW ,Raufman JP. Liver biopsy in the evaluation of patients with chronic Hepatitis C who have

- repeatedly normal or near-normal serum alanine aminotransferase levels. *Am J Med.* 2000;109(1):62-4.
82. Bacon BR. Treatment of patients with hepatitis C and normal serum aminotransferase levels. *Hepatology.* 2002;36(5):S179-S184.
83. Pasquale G, Sagneli E, Coppola N, Scarano F, Scolastico C, Bellomo PF, Lettieri A and Piccinino F. Is liver biopsy necessary for hepatitis C virus carriers with persistently normal aminotransferase levels? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003;15:831-3.
84. Cividini A, Rebucci C, Silini E and Mondelli MU. Is the natural history of hepatitis C virus carriers with normal aminotransferase really benign? *Gastroenterology.* 2001;121:1526-31.
85. Kyrilagkitsis I, Portmann B, Smith H, O'Grady J, Cramp ME. Liver histology and progression of fibrosis in individuals with chronic hepatitis C and persistently normal ALT. *Am J Gastroenterol.* 2003 Jul;98(7):1588-93.
86. Di Bisceglie AM, Martin P, Kassianides C, Lisker-Melman M, Murray L, Waggoner J, Goodman Z, Banks SM and Hoofnagle JH. Recombinant interferon alfa therapy for chronic hepatitis C. *N Engl J Med.* 1989;321(22):1506-10.

87. Sangiovanni A, Morales R, Spinzi G, Rumi M, Casiraghi A, Ceriani R, Colombo E, Fossati M, Prada A, Tavani E and Minoli G. Interferon alfa treatment of HCV RNA carriers with persistently normal transaminase levels: a pilot randomized controlled study. *Hepatology*. 1998; 27(3):853-6.
88. Shiffman ML, Stewart CA, Hofmann CM, Contos MJ, Luketic VA, Sterling RK and Sanyal AJ. Chronic infection with Hepatitis C virus in patients with elevated or persistently normal serum alanine aminotransferase levels: comparison of hepatic histology and response to interferon therapy. *J Infect Dis*. 2000;182:1595-601.
89. Mangia A, Spinzi G, Vuturo O, Pazienza V, Iacobellis A, Piatteli M, Giacobbe A, Leandro G, Piermanni V, Minolo G, Montalto G & Andriulli A. Viral clearance in HCV viraemic patients with normal alanine aminotransferase after combination therapy: a controlled, open-labelled study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;19:331-7.
90. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. *Programa Nacional de Hepatites Virais. Programa Nacional de Hepatites Virais: avaliação da assistência as hepatites virais no Brasil*. Brasília: Ministério da Saúde 2002;7.

91. Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inogoue O, Hashimoto E, Lefkowitz JH, Ludwig J and Okuda K. The long-term pathological evolution of chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 1996;23(6):1334-40.
92. Ansaldi F, Torre F, Bruzzone BM, Picciotto A, Crovari P, Icardi G. Evaluation of a new hepatitis C virus sequencing assay as a routine method for genotyping. *J Med Virol*. 2001; 63:17-21.
93. Germer JJ, Majewski DW, Rosser M, Thompson A, Mitchell SP, Smith TF, Elagin SA et al. Evaluation of the TRUGENE HCV 5'NC genotyping kit with the new gene Librarian Module 3.1.2 for genotyping of hepatitis C virus from clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2003; 48:55-7.
94. Halfon P, Trimoulet P, Bourliere M, Khiri H, de Ledinghen V, Couzigou P et al. Hepatitis C virus genotyping based on 5' noncoding sequence analysis (Trugene). *J Clin Microbiol*. 2001;39:1771-3.
95. Mizokami M, Ohno T. Determination of HCV quasispecies by cloning and sequencing. In: Lau JY - N editor. Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine. *Humana Press* September 1998;29:207-12.

96. Simmonds P, Rose KA, Graham S, Chan SW, MComich F, Dow BC, Follett EAC, Yap PL, Marsden H. Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS-4 region of hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1,2, and 3. *J Clin Microbiol.* 1993,v.31,p.1493-503.
97. Bhattacharjee V, Prescott LE, Pike I, Rodgers B, Bell H, El-Zayadi AR, Kew MC, Conradie J, Lin CK, Marsden H, Saeed AA, Parker D, Yap PL, Simmonds P. Use of NS-4 peptides to identify antibody to hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3, 4, 5 and 6. *J Gen Virol.* 1995,v.76, p.1737-48.
98. Prescott LE, Simmonds P. Serological genotyping using synthetic peptides derived from the NS4 region. In: LAU, JOHNSON YIU-NAM. *Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine. Humana Press* 1998;17;199-205.
99. Lau JYN, Davis GL, Prescott LE, Maertens G, Lindsay KL, Qian K, Mizokami M, Simmonds P, Hepatitis Interventional Therapy Group. Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen at tertiary referral centers in the United States. *Ann Intern Med.* 1996;124;868-76.

100. Montesano L, Gutiérrez M, Bravo R, Baquero M, Soriano V. Correlation between serological and genetic methods for typing hepatitis C virus. *Vox Sang.* 1996;71;190-1.
101. Webber LM, Els S, Taylor MB, Grabow WOK. Assessment of commercial enzyme immunoassay for hepatitis C virus serotype. *J Clin Pathol.* 1996;49;994-7.
102. Cretel E, Gallian P, Obadia Y, Rousseau S, De Micco P, De Lamballerie X. Analysis of hepatitis C virus isolates using molecular and serological typing methods. *Acta Virol.* 1997;41;269-75.
103. Pawlotsky JM; Prescott L, Simmonds P, Pellet C, Laurent-Puig P, Labonne C, Darthuy F, Remire J, Duval J, Buffet C, Etienne JP, Dhumeaux D, Dussaix E. Serological determination of hepatitis C virus genotype: comparison with a standardized genotyping assay. *J Clin Microbiol.* 1997;35;1734-9.
104. Leruez-Ville M, Nguyen QT, Cohen P, Cocco S, Nouyou M, Ferrière F, Dény P. Large-scale analysis of hepatitis C virus serological typing assay: effectiveness and limits. *J Med Virol.* 1998;55;18-23.
105. Renou C, Halfon P, Pol S, Cacoub P, Jouve E, Bronowicki JP, Arpurt JP, Rifflet H, Picon M, Causse X, Canva V, Denis J, Tran A, Bourlière

- M, Ouzan D, Pariente A, Dantin S, Alric L, Cartier V, Reville M and Caillat-Zucman S. Histological features and HLA class II alleles in hepatitis C virus chronically infected patients with persistently normal alanine aminotransferase levels. *Gut*. 2002;51:585-90.
106. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J and Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2001;34:730-9.
107. Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V, Pereira LMMB, Coelho HSM, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CMC and Bernardini AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2005 38:41-9.
108. Isobe K, Imoto M, Fukuda Y, Koyama Y, Nakano I, Hayakawa T, Takamatsu J. Hepatitis C virus infection and genotypes in Japanese hemophiliacs. *Liver*. 1995;15:131-4.
109. Giannini C, Giannelli F, Monti M, Careccia G, Marrocchi ME, Laffi G, Gentilini P and Zignego AL. Prevalence of mixed infection by different hepatitis C virus Genotypes in patients with hepatitis C virus-related liver disease. *J Lab Clin Med*. 1999;134(1):68-73.

110. Puoti C, Guido M, Mangia A, Persico M, Prati D. Clinical management of HCV carriers with normal aminotranferase. *Dig Liv Dis.* 2003; 35:362-9.
111. Soriano V, Puoti M, Sulkowisk M, Mauss S, Cacoub P, Cargnel A, Dieterich D, Hatzakis A and Rockstroh J. Care of patients with hepatitis C and HIV co-infection. *Aids.* 2004;18:1-12.
112. Martin Carbonero L, Benhamou Y, Puoti M , Berenguer J, Mallolas J, Quereda C, Arizcorreta A, Gonzalez A, Rockstroh J, A sensi V, Miralles P, Laguno M, Moreno L, Giron JA, Vogel M, Garcia-Samaniego J, Nunez M, Romero M, Moreno S, de la Cruz JJ and Soriano V. Incidence and predictors of severe liver fibrosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic hepatitis C:a European collaborative study. *Clin Infect Dis.* 2004;38(1):128-33.
113. Kumar D, Farrell G, Fung Cand George J. Hepatitis c virus genotype 3 is cytopathic to hepatocytes: reversal of hepatic steatosis after sustained therapeutic response. *Hepatology.* 2002;36(5):1266-72.
114. Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R and Ruggiero G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic Hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology.* 2001;33(6):1358-64.

115. Hui K-Q, Belye T, Montegrando K and Wright TL. A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase. *J Hepatol* 2003;(38):511-7.
116. Fontaine H, Nalpas B, Poulet B, Carnot F, Zylberberg H, Brechot C and Stanislas Pol. Hepatitis activity index is a key factor in determining the natural history of chronic hepatitis C. *Human Pathology* 2001;32(9):904-9.
117. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Sistemas e Redes Assistenciais Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Hepatite Viral Crônica C. Portaria 863; 2002.