



Universidade Federal do Pampa

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

JULIANA MEZZOMO

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PORTADORES DA HEPATITE C
QUE FAZEM USO DA TERAPIA COMBINADA COM INTERFERON ALFA
PEGUILADO E RIBAVIRINA**

Dissertação de Mestrado

URUGUAIANA

2017

JULIANA MEZZOMO

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PORTADORES DA HEPATITE C
QUE FAZEM USO DA TERAPIA COMBINADA COM INTERFERON ALFA
PEGULADO E RIBAVIRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanusa Manfredini

**Uruguaiiana
2017**

JULIANA MEZZOMO

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PORTADORES DA HEPATITE C
QUE FAZEM USO DA TERAPIA COMBINADA COM INTERFERON ALFA
PEGULADO E RIBAVIRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Fundação Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção Molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 03 de julho de 2017.
Banca examinadora:

Prof. Dr^a. Vanusa Manfredini
Orientador
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UNIPAMPA

Prof. Dr^a. Cheila Denise Ottonelli Stopiglia
Universidade Federal do Pampa

Prof. Dr^a. Morgana Duarte da Silva
Universidade Federal do Pampa

Aos meus pais, Esino e Débora, meu irmão Julio,
por todo incentivo e apoio permanente.
O amor e compreensão que recebo de vocês é o
que me impulsiona a seguir em frente.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço a Deus por iluminar meu caminho e por me dar forças para eu agir com sabedoria quando a situação parecia desesperadora.

Agradeço a minha família, minha Mãe Débora, meu Pai Esino, meu Irmão Julio, pelas orações, pelo meu sucesso e felicidade.

Agradeço in memoriam ao meu irmão Lucas, que com certeza estaria feliz por mim.

À minha orientadora, Prof. Dra. Vanusa Manfredini, pela oportunidade, pela compreensão, pela paciência, por todas orientações e pela amizade. Meu muito obrigada!

Agradeço aos meus chefes Dr Ilson Dias da Silveira e Dr Gilnei Porciunculla, pela compreensão e por me liberarem todas as vezes que precisei me ausentar. Muito Obrigada!

Aos colegas do Grupo de Estudos em Estresse Oxidativo (GESTOX), Bruna, Emanuelle, Ritiele, Luísa, Taiane, Patricia Maurer, Patricia Martinez, Deise, Denise, Angélica (Guega) Alessandra, Vinicius, Micaela, Nariani e Lyana, por toda a ajuda durante esta caminhada. Obrigada pela parceria, paciência. E também pela amizade construída no decorrer desse período. Agradeço de coração... Muitíssimo Obrigada!!!

Aos membros da banca, as Prof.^a Dr.^a Cheila Denise Ottonelli Stopiglia e Morgana Duarte da Silva, pela disponibilidade e contribuição científica na avaliação deste trabalho.

À Karoline Torres, pela ajuda imprescindível, pela amizade. Obrigada!

À Secretaria de Saúde de Uruguaiana e a farmacêutica Raqueli Bittencourt pelo apoio na realização deste trabalho.

À Mariana Ziolkowsk e a Ana Izabel Vargas Ausani, pela ajuda nas coletas das amostras e por estarem sempre disponíveis todas as vezes que precisei. Agradeço de coração.

À Fundação Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBIOQ) pela oportunidade.

A todos os professores do PPG-Bioquímica pelos ensinamentos transmitidos.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído com sucesso, os meus sinceros agradecimentos.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Universidade Federal do Pampa

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PORTADORES DA HEPATITE C QUE FAZEM USO DA TERAPIA COMBINADA COM INTERFERON ALFA PEGUILADO E RIBAVIRINA

Autora: Juliana Mezzomo
Orientadora: Vanusa Manfredini
Local e Data da Defesa: Uruguaiana, 03 de Julho de 2017.

As hepatites virais constituem atualmente uma relevante questão de saúde pública no Brasil e no mundo, distribuindo-se de maneira universal, atingindo vários segmentos da população e causando grande impacto de morbidade e mortalidade. O tratamento padrão para a hepatite viral C durante as últimas décadas foi a terapia combinada de interferon alfa-peguilado (PEG-IFN) com ribavirina (RBV), um análogo de guanosina que interrompe o metabolismo de RNA viral. O tratamento das formas crônicas baseia-se nesta combinação de fármacos, por um período de 24 a 48 semanas, dependendo do genótipo viral encontrado. A hepatite C apresenta elevado impacto na saúde pública global. Estudos recentes sugerem o envolvimento do estresse oxidativo na patogenia da hepatite C e carcinoma hepatocelular (CHC). O dano celular oxidativo desempenha um papel importante na fisiopatologia do vírus da hepatite C (HCV). O estresse oxidativo é desencadeado quando a concentração de espécies de oxigênio no ambiente extracelular ou intracelular excede as defesas antioxidantes. O mecanismo exato pelo qual isto ocorre não está totalmente compreendido, incluindo dano hepático imunológico, dano diretamente citotóxico mediado por diferentes produtos virais, bem como o estresse oxidativo, têm sido sugeridos na patogênese da hepatite C. Nos últimos anos tem sido demonstrado o envolvimento do estresse oxidativo na progressão da hepatite C, sendo que a resposta imune aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Entretanto, pouco se sabe sobre o envolvimento do estresse oxidativo nos portadores da hepatite C em tratamento combinado com PEG-IFN e RBV. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de estresse oxidativo em portadores da hepatite C que fizeram uso da terapia combinada com interferon alfa peguilado e ribavirina. Foram recrutados 43 portadores de hepatite viral C no serviço de referência do município de Uruguaiana e submetidos a uma coleta de sangue venoso. Foram divididos em quatro grupos: diagnosticado com HCV (livre de tratamento farmacológico combinado), tempo 1 (início do tratamento combinado), tempo 2 (metade do tratamento combinado) e tempo 3 (final do tratamento combinado). Os parâmetros de estresse oxidativo foram determinados por metodologias clássicas. Os resultados mostram que os portadores de HCV possuem aumento significativo dos marcadores de função hepática, sendo que as atividades da TGO (transaminase glutâmico-oxalacética) e TGP (transaminase glutâmico-pirúvica) são reestabelecidas após o tratamento combinado. Foi observado também que as defesas enzimáticas e não enzimáticas estão diminuídas no grupo HCV em comparação ao grupo controle e a terapia antiviral combinada por vezes, consegue reverter esses parâmetros. Já o dano oxidativo a biomoléculas está aumentado nesses portadores e o tratamento combinado melhora esses parâmetros, porém não em níveis do grupo controle.

Assim, os resultados sugerem que o portador de HCV tem aumento do estresse oxidativo no momento do diagnóstico e o tratamento combinado parece melhorar essa condição.

Palavras-chave: hepatite C, estresse oxidativo, interferon alfa peguilado, ribavirina, defesas antioxidantes

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Program of Post-Graduation in Biochemistry
Federal University of Pampa

EVALUATION OF THE OXIDATIVE STRESS IN HEPATITIS C CARRIERS THAT MAKE USE OF THE COMBINED THERAPY WITH PEGYLATED INTERFERON ALPHA AND RIBAVIRIN

Author: Juliana Mezzomo

Advisor: Vanusa Manfredini

Date and Place of Defense: Uruguaiana, July 03, 2017.

Viral hepatitis is currently a relevant public health issue in Brazil and the world; it is ubiquitous, reaching several segments of the population and causing severe morbidity and mortality. The standard treatment for viral hepatitis C during the last few decades has been combination therapy with alpha-pegylated interferon (PEG-IFN) and ribavirin (RBV), a guanosine analog that disrupts viral RNA metabolism. The treatment of chronic forms is based on this combination of drugs, for a period of 24–48 weeks, depending on the viral genotype found. Hepatitis C has a high impact on global public health. Recent studies suggest the involvement of oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C and hepatocellular carcinoma. Oxidative cellular damage plays an important role in the pathophysiology of hepatitis C virus (HCV). Oxidative stress is triggered when the concentration of oxygen species in the extracellular or intracellular environment exceeds the capacity for antioxidant defense. The exact mechanism by which this occurs is not fully understood, and immune hepatic damage, direct cytotoxic damage mediated by different viral products, and oxidative stress have been implicated in the pathogenesis of hepatitis C. . In recent years, the involvement of oxidative stress in the progression of hepatitis C has been demonstrated, and the immune response increases the production of reactive oxygen species. However, little is known about the involvement of oxidative stress in hepatitis C patients on combined treatment with PEG-IFN and RBV. Thus, the objective of this study was to determine oxidative stress profile in hepatitis C patients who used combination therapy with pegylated interferon alfa and ribavirin. A total of 43 patients with viral hepatitis C were recruited at the referral service in the city of Uruguaiana, and venous blood was collected. The HCV group was divided into four groups: diagnosis (free of combined pharmacological treatment), time 1 (onset of combined treatment), time 2 (half of the combined treatment), and time 3 (final of the combined treatment). The parameters of oxidative stress were determined by classical methodologies. The results show that HCV carriers had a significant increase in markers of hepatic function, and the activities of GOT (glutamic-oxaloacetic transaminase) and TGP (glutamic-pyruvic transaminase) are reestablished after the combined treatment. Enzymatic and non-enzymatic defenses were decreased in the HCV group relative to the control group, and combined antiviral therapy sometimes reversed these parameters. Oxidative damage to biomolecules was already increased in these carriers, and combined treatment improved these parameters, but in the control group, levels remained unchanged. Thus, the results suggest that HCV carriers have increased oxidative stress at the time of diagnosis, and combined treatment seems to improve this condition.

Key words: hepatitis C, oxidative stress, pegylated interferon alpha, ribavirin, antioxidant defenses

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - História Natural da Hepatite C.....	23
Figura 2 - Estrutura do vírus da hepatite C (HCV)	24
Figura 3 - Representação esquemática da organização genômica do HCV	25
Figura 4 - Distribuição dos principais genótipos do vírus da hepatite C nas diferentes regiões brasileiras.....	26
Figura 5 - Taxa de detecção de hepatite C segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2002 a 2015.....	29
Figura 6 - Distribuição dos óbitos associados às hepatites virais segundo agente etiológico. Brasil, 2000 a 2014.....	29
Figura 7 - Proporção de casos de hepatite C segundo provável fonte ou mecanismo de infecção e ano de notificação. Brasil, 2002 a 2015.	30
Figura 8 - Casos de hepatite viral C notificados no município de Uruguaiana-RS de 2007 a 2015.....	31
Figura 9 - Tratamento medicamentoso recomendado de acordo com genótipo da hepatite C crônica, até o ano de 2013.....	35
Figura 10 - Mudanças no padrão de tratamento para HCV, e melhorias em número de respostas virológica sustentada.....	36
Figura 11 - Etapas da peroxidação lipídica.	42

MANUSCRITO

Figure 1 - Activity of the antioxidant enzymes of the study participants.	55
Figure 2 - Non-enzymatic defenses of study participants.	56
Figure 3 - Oxidative damage to biomolecules of study participants	57

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1 - Socio-demographic profile of viral hepatitis C bearers in the study.....	53
Table 2 - Hematologic and biochemical profile of patients with viral hepatitis C at the time of diagnosis and along the combined treatment with ribavirin and pegylated interferon alpha.	54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGPI	Ácidos Graxos Poliinsaturados
ARG	Arginina
CAT	Catalase
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CO	Grupamentos Carbonílicos
DAA	Antivirais de Ação Direta
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EASL	Associação Europeia para o Estudo do Fígado
EDHS	<i>Egypt Demographic and Health Survey</i>
EO	Estresse Oxidativo
ER	Espécies Reativas
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and drug administration</i>
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HC	Hepatites Virais
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HOCL	Ácido Hipocloroso
INF-α	Interferon
LIS	Lisina
MDA	Malondialdeído
N₂O	Oxido Nitroso
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NO•	Radical Óxido Nítrico
¹O₂	Oxigênio Singlete
O₂•-	Radical Ânion Superóxido
OH•	Radical Hidroxila
ONOO-	Ânion Peroxinitrito
PEGINF	Interferon Peguilado
PRO	Prolina
RBV	Ribavirina
RL	Radical livre
ROO•	Peroxila
RVS	Resposta Viroológica Sustentada
SIM	Sistema de Informações sobre Mortalidade
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SOD	Superóxido Dismutase
TAS	<i>Status Antioxidante Total</i>
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
TR	Teste rápido
TER	Treonina
VHC	Vírus hepatite C
VPP	Valor Preditivo Positivo
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

PARTE I	18
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Hepatites Virais	21
2.1.1 Hepatite C.....	22
2.1.2 Vírus da hepatite C.....	24
2.2 Epidemiologia	27
2.2.1 No mundo	27
2.2.2 No Brasil	28
2.2.3 Rio Grande do Sul	30
2.2.4 Município de Uruguaiana	31
2.3 Diagnóstico	31
2.3.1 Testes sorológicos.....	32
2.3.1.1 Testes Rápidos	32
2.3.1.2 Imunoensaio	32
2.3.1.3 Testes Moleculares.....	32
2.3.1.4 Genotipagem	33
2.4 Tratamento	33
2.4.1 Tratamento Combinado.....	33
2.4.2 Tratamento atual	35
2.5 Estresse Oxidativo	37
2.6 Defesas Antioxidantes	38
2.6.1 Defesas antioxidantes enzimáticas	39
2.6.2 Defesas antioxidantes não enzimáticas	39
2.6.2.1 Glutationa reduzida (GSH)	40
2.6.2.2 Vitamina C	40
2.6.3 Dano Oxidativo	40
2.6.3.1 Dano a proteínas	41
2.6.3.2 Dano a lipídios de membrana	41
2.6.3.3 Dano oxidativo ao material genético.....	42
2.7 Estresse Oxidativo na hepatite C	43
3 OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
PARTE II	45
MANUSCRITO	45
ABSTRACT	47
1 INTRODUCTION	48
2. MATERIALS AND METHODS	49
2.1 Patient selection	49
2.1.1 Inclusion criteria.....	49
2.1.2 Exclusion criteria.....	49
2.2 Characterization of the sample	49
2.3 Parameters analyzed	50

2.3.1 Hematological and biochemical profiles.....	51
2.3.2 Evaluation of the parameters of oxidative stress and antioxidant defenses.....	51
2.3.2.1. Antioxidant defenses	51
2.3.2.2. Oxidative damage	51
2.4 Statistical analysis.....	51
2.5 Ethical aspects.....	52
3 RESULTS	52
4. DISCUSSION.....	58
5 CONCLUSIONS.....	60
CONFLICTS OF INTEREST STATEMENT	60
REFERENCES	60
PARTE III.....	64
4 CONCLUSÃO.....	64
5 PERSPECTIVAS.....	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	76
Anexo A - Ficha Farmacoterapêutica	76

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi dividida em três partes principais. Na **parte I** encontram-se a **INTRODUÇÃO**, a **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e os **OBJETIVOS**. Os resultados que fazem parte desta dissertação, assim como as seções materiais e métodos, resultados, discussão e referências, estão apresentados sob a forma de manuscrito, no item **MANUSCRITO**, que está na **parte II** deste trabalho. O item **CONCLUSÃO**, que apresenta interpretações e comentários gerais sobre os resultados mostrados nos manuscritos deste trabalho, encontra-se na **parte III** desta dissertação, assim como o item **PERSPECTIVAS**, onde estão expostos os possíveis estudos para dar continuidade a este trabalho, e o item **REFERÊNCIAS**, que se refere somente às citações que aparecem nos itens introdução e revisão bibliográfica desta dissertação.

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

As hepatites virais são doenças infecciosas de transmissibilidade inter-humana, evolução aguda ou crônica, que por sua alta morbidade universal constituem importante problema de saúde pública (FOCACCIA, 1998). Dentre elas, a hepatite C representa um dos maiores problemas para a saúde pública mundial devido à sua gravidade, sendo hoje a causa mais comum de indicação de transplante hepático (RODRIGUES et al., 2012). Sua evolução é lenta, possui elevada taxa de cronicidade e é potencialmente fatal, caracterizando-se como a maior causadora de óbitos entre todos os tipos de hepatite (FOCACCIA, 2007).

O vírus da hepatite C (HCV) é um vírus RNA da família *Flaviviridae*; foi inicialmente isolado no soro de uma pessoa com hepatite não-A não-B em 1989 por Choo e colaboradores. O HCV caracteriza-se pela elevada variabilidade genética, sendo atualmente classificados em 11 genótipos (designados de 1-11) que diferem na sua sequência de nucleotídeos, e seis dos quais são os principais genótipos (1-6) (CHAYAMA & HAYES, 2011; WANG, 2013; SMITH et al, 2014). Os diferentes genótipos mostram padrões de distribuição distintos, o que reflete diferenças na epidemiologia, incluindo os modos de transmissão e variabilidade étnica em diferentes países. Os genótipos 1, 2 e 3 são universalmente distribuídos, acometendo a maioria dos casos no mundo, ao passo que os outros genótipos estão limitados às áreas geográficas mais específicas (GOWER et al, 2014; MESSINA et al, 2015). A transmissão do vírus ocorre, principalmente, pelo contato com o sangue infectado por exposição percutânea: compartilhamento de equipamentos para uso de drogas injetáveis (18%) ou de objetos de uso pessoal, como lâminas de barbear ou depilar, escovas de dente e instrumentos para *pedicure/manicure*. Além disso, pode ser transmitido por confecção de tatuagens e colocação de *piercing*, transfusão de sangue e/ou hemoderivados, transplantes de órgãos de doadores infectados, transmissão vertical e sexual (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009; BRASIL, 2011). No entanto, nos casos notificados no Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais, observa-se um elevado percentual de via de transmissão ignorada (43%) (BRASIL, 2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 170 milhões da população mundial estão infectados pela forma crônica da hepatite C (WHO, 2012). No Brasil, a doença hepática crônica é a maior responsável por cirrose e transplante hepático no

mundo ocidental (FOCACCIA, 2007; RODRIGUES et al, 2012) e a infecção atinge aproximadamente dois a três milhões da população, sendo que dos novos casos apenas 50% são sintomáticos e cerca de 18.000 a 30.000 novas infecções crônicas serão produzidas anualmente (RODRIGUES et al, 2012). Estudos realizados no Brasil confirmaram 69.952 casos de hepatite C no período de 1999 a 2010. Destes, 47.830 provêm da Região Sudeste e 15.095 da Região Sul, que juntas concentram 90% dos casos confirmados no país. Dentre as Unidades Federadas, destacam-se São Paulo e Rio Grande do Sul, com 58,7% (41.033) e 13,1% (9.143), respectivamente, dos casos confirmados de hepatite C no país (BRASIL, 2016). As áreas com maior prevalência incluem o Norte de África, no Oriente Médio, e Central e no Leste Asiático (MOHD, 2013) Um relatório recente mostrou que, em 2007, a infecção por HCV tinha substituído a infecção pelo HIV como uma causa de morte nos Estados Unidos (BRASIL, 2011) No Rio Grande do Sul, na fronteira oeste do Estado, o município de Uruguaiana apresenta uma elevada prevalência da infecção pelo HCV. Dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) apontaram no período de 2007 a 2015, 341 casos notificados de hepatite viral C (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O diagnóstico da hepatite C pode ser realizado a partir da sequência de manifestações clínicas, mas, na maioria das vezes, é feito de forma esporádica, no decurso da investigação de alterações das transaminases ou de um programa de rastreio (AUGUSTO & LOBATO, 2004). O diagnóstico da hepatite C baseia-se na identificação do vírus ou dos seus anticorpos. No seguimento clínico dos portadores da hepatite C utilizam-se dois tipos de testes virológicos: testes sorológicos e testes de biologia molecular. A definição do agente é feita pelo marcador sorológico anti-HCV, o qual é recomendado como teste inicial para pacientes que apresentam sintomas e/ou sinais clínicos sugestivos de doença hepática. Indica contato prévio com o vírus da hepatite C, mas não define se recente ou tardio. O diagnóstico de infecção aguda só pode ser feito com a viragem sorológica documentada. A infecção crônica deve ser confirmada pela pesquisa qualitativa de HCV-RNA. (BRASIL, 2011).

O tratamento padrão para a hepatite C durante as últimas décadas foi a terapia combinada de interferon alfa-peguilado (PEG-IFN) que é uma citocina que compõe a resposta inata do hospedeiro humano com ribavirina (RBV), um análogo da guanósina que interrompe o metabolismo do RNA viral. O tratamento das formas crônicas baseia-se na combinação de interferon ou PEG-IFN com RBV, por um período de 24 a 48 semanas, dependendo do genótipo encontrado, obtendo-se um *clearance* em torno de 80% para os genótipos virais 2 e 3 e cerca de 40% para o genótipo 1 (GHANY et al, 2009; FERENCI et al., 2010). Ao longo do tratamento, o portador realiza exames hematológicos, bioquímicos (função hepática e

renal) e quantifica a carga viral para o monitoramento das lesões no fígado (FERENCI et al., 2010).

Estudos tem sugerido o envolvimento do estresse oxidativo na patogenia da hepatite C e carcinoma hepatocelular. Acredita-se que as causas do estresse oxidativo na infecção pelo vírus C incluem vários fatores, como dano mitocondrial, acúmulo de ferro no fígado, resposta inflamatória via imunorreação e ação direta das proteínas virais. O mecanismo exato pelo qual isto ocorre não está totalmente compreendido; no entanto, possíveis mediadores da patogênese da hepatite C como as espécies reativas de oxigênio (ERO). Durante a hepatite crônica, a resposta imune induz a produção de ERO e óxido nítrico (NO). O estresse oxidativo induzido por ERO tem uma estreita associação com o processo inflamatório na hepatite C (JAESCHKE et al, 2011; CHOI et al, 2012). Os indivíduos saudáveis possuem mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo como os compostos antioxidantes, a citar: a glutathiona (GSH), vitamina C e vitamina E, e as enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase. No entanto, em portadores da hepatite C crônica, esses mecanismos de proteção parecem estar prejudicados, devido a exposição à longo prazo ao estresse oxidativo durante infecção viral podendo evoluir para hepatocarcinoma (FUJINAGA et al, 2011; TSUKIYAMA, 2012). Desta forma, o estresse oxidativo apresenta um importante papel no desenvolvimento e/ou na progressão de lesões hepáticas, e a avaliação pode ser útil para melhor compreensão da patogênese nos portadores da hepatite C em tratamento combinado com PEG-IFN e RBV.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hepatites Virais

As hepatites virais (HV) são um grupo de viroses sistêmicas hepatotrópicas que produzem quadros de hepatite aguda (inaparente ou sintomática). Dependendo do agente etiológico, da carga viral e das condições do hospedeiro, pode evoluir para hepatite crônica, cirrose, câncer de fígado e formas agudas fulminantes (MOSLEY, 1972; GAZE et al., 2013).

As hepatites virais constituem atualmente uma relevante questão de saúde pública no Brasil e no mundo, distribuindo-se de maneira universal, atingindo vários segmentos da população e causando grande impacto de morbidade e mortalidade (BRASIL, 2016).

A hepatite é uma inflamação das células que compõem o fígado, as quais são denominadas de hepatócitos (BRASIL, 2009). Essa inflamação compromete o funcionamento regular do fígado e, se não tratada a tempo, pode evoluir levando o paciente ao óbito. As hepatites podem ser de origem tóxica ou infecciosa. Quando tóxica, a lesão hepática pode ser causada por uso excessivo de medicamentos, bebidas alcoólicas, drogas ou outras substâncias tóxicas; quando infecciosa, as hepatites são causadas por agente viral (COSTA PASSOS, 2003).

As hepatites virais agudas e crônicas são doenças provocadas por diferentes agentes etiológicos, sendo eles vírus da hepatite A, B, C, D ou E, com tropismo primário pelo tecido hepático, apresentando características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais semelhantes, porém com importantes particularidades (BRASIL, 2015). A distribuição das hepatites virais é universal, sendo que a magnitude dos diferentes tipos varia de região para região. No Brasil, também há grande variação regional na prevalência de cada hepatite (BRASIL, 2008).

A doença tem um amplo espectro clínico, que varia desde formas assintomáticas, anictéricas e ictéricas típicas, até a insuficiência hepática aguda grave (fulminante). A maioria das hepatites virais agudas é assintomática, independentemente do tipo de vírus (BRASIL, 2009).

Quando apresentam sintomatologia, são caracterizadas por fadiga, mal-estar, náuseas, dor abdominal, anorexia e icterícia. A hepatite crônica, em geral, cursa de forma assintomática. As manifestações clínicas aparecem quando a doença está em estágio avançado, com relato de fadiga, ou, ainda, cirrose (BRASIL, 2015).

Determinados vírus podem se propagar de diferentes modos e circular simultaneamente com outros na mesma localidade, configurando natureza espectral e

cambiante de transmissão no tempo e no espaço (AGGARWAL & NAIK, 2009). Isso agrega complexidade à formulação de propostas de prevenção e controle para esses agravos. A versatilidade ecológica desses vírus, potencializada pelo curso subclínico ora prolongado de grande parte das infecções, constitui-se em um desafio epidemiológico (MOSLEY, 1972; GAZE et al., 2013).

2.1.1 Hepatite C

O vírus da hepatite C (HCV) é o agente responsável pela inflamação do fígado cuja progressão leva à hepatite C. Esta enfermidade constitui um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial da atualidade pelo fato de ser uma doença insidiosa, de proporção elevada para cronicidade (80% dos casos), de frequente etiologia em casos de transplante hepático, com potencial evolutivo para cirrose, hepatocarcinoma, baixa efetividade no tratamento (40-50%) e ausência de uma vacina (STRAUSS et al. 2001).

De acordo com estimativas recentes, mais de 185 milhões de pessoas em todo o mundo foram infectadas com o HCV, dos quais 350.000 morrem a cada ano, sendo relevante o número de indivíduos que desconhecem sua condição de portadores do vírus (WHO, 2014).

A transmissão da hepatite C ocorre principalmente por via parenteral (ALTER et al., 1990). É importante ressaltar que, em percentual significativo de casos, não é possível identificar a via de infecção. São consideradas populações de risco acrescido para a infecção pelo HCV por via parenteral: indivíduos que receberam transfusão de sangue e/ou hemoderivados antes de 1993, usuários de drogas injetáveis (cocaína, anabolizantes e complexos vitamínicos), inaláveis (cocaína) ou pipadas (crack) que compartilham os equipamentos de uso, pessoas com tatuagem, *piercings* ou que apresentem outras formas de exposição percutânea (consultórios odontológicos, podólogos, manicures, etc., que não obedecem as normas de biossegurança). A transmissão sexual é pouco frequente – menos de 1% em parceiros estáveis – e ocorre principalmente em pessoas com múltiplos parceiros e com prática sexual de risco (sem uso de preservativo), sendo que a coexistência de alguma DST – inclusive o HIV – constitui-se um importante facilitador dessa transmissão (AQUINO et al., 2008; BRASIL, 2010). A transmissão vertical é rara quando comparada a hepatite B. Entretanto, já se demonstrou que gestantes com carga viral do HCV elevada ou co-infectadas pelo HIV apresentam maior risco de transmissão da doença para os recém-nascidos (BRASIL, 2008).

A hepatite C é uma doença que evolui lentamente, com uma história natural da doença dividida em duas fases distintas (AUGUSTO & LOBATO, 2004):

- Aguda - com período de incubação variando de 2 semanas a 6 meses e os pacientes, na maior parte, não apresentam sintomas clínicos ou acompanham-se de sintomas ligeiros, muitas vezes inespecíficos (astenia, anorexia, mal estar ou dor abdominal). Em 20% a 30% dos casos pode haver icterícia, mal estar e náusea.

- Crônica – a progressão para a fase crônica depende de alguns fatores como duração prolongada e idade avançada na época da infecção, alto consumo de álcool, infecção pelo genótipo tipo 1 ou co-infecção com hepatite B ou HIV.

As principais complicações potenciais da infecção crônica pelo vírus da hepatite C, a longo prazo, são cirrose, insuficiência hepática terminal e carcinoma hepatocelular (BRASS et al., 2007).

A história natural precisa da hepatite C é de difícil avaliação, pela falta de dados prospectivos, dificuldade de definir a data de transmissão e associações com outros fatores que alteram o curso da doença, como co-infecções e uso de álcool. Entretanto, como mostra a figura abaixo (Figura 1), a partir da infecção aguda 15% evoluem para cura e 85% para cronicidade da doença, sendo que destes 60 a 70% permanecem estáveis, e 30 a 40% evoluem de forma progressiva para cirrose (1-7% ao ano) e hepatocarcinoma (1-4%) (RODRIGUES-LUNA & DOUGLAS, 2004).

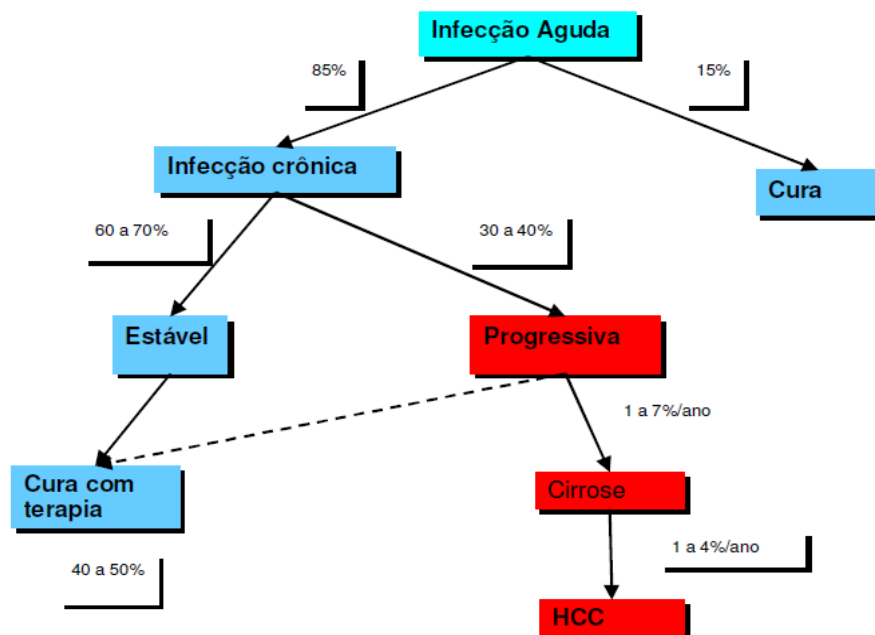


Figura 1 - História Natural da Hepatite C
Fonte: Adaptado de Rodrigues-Luna & Douglas (2004).

2.1.2 Vírus da hepatite C

A hepatite C é uma inflamação causada pela infecção com o vírus da hepatite C que pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus*. O agente etiológico foi clonado em 1989 de uma cópia do DNA complementar, extraído do plasma de um chimpanzé infectado experimentalmente com sangue de um portador de hepatite não-A, não-B (CHOO et al, 1989). A partir daí foram desenvolvidos testes sorológicos para detecção de anticorpos específicos anti-HCV. Estes testes permitiram constatar que a hepatite C era responsável por cerca de 90% dos casos de hepatite pós-transfusional (FOCACCIA, 1997).

O vírus é envelopado, de fita simples, possuindo genoma de RNA, de polaridade positiva com cerca de 9.400 nucleotídeos (WHO, 2014) (Figura 2).

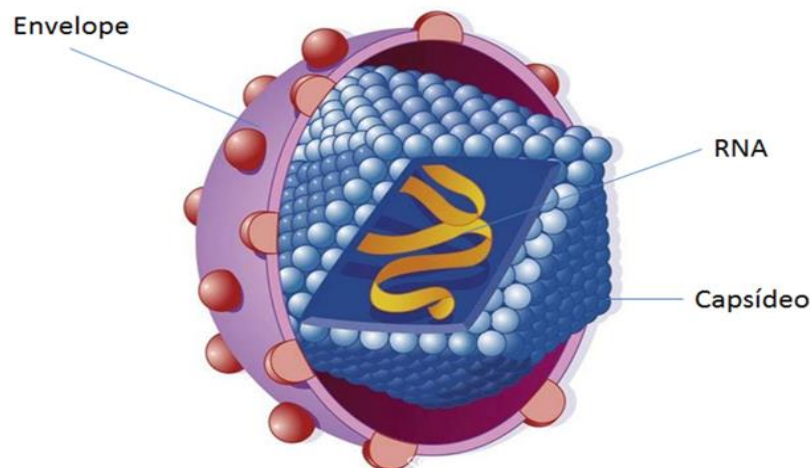


Figura 2 - Estrutura do vírus da hepatite C (HCV)

Fonte: Suzuki et al., 2007.

Os nucleotídeos codificam um grande polipeptídeo precursor com cerca de 3.000 aminoácidos que, pela ação das proteases virais e celulares é clivado em proteínas estruturais (core, envelope 1(E1) e envelope 2(E2)) e proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (IRSHAD et al., 2013). Na extremidade amino-terminal do genoma (extremidade 5') existe uma região não codificada de aproximadamente 324 nucleotídeos precedendo a sequência codificada. Esta região é, aparentemente, a região mais conservada do genoma viral e acredita-se que tem um papel muito importante na replicação do vírus. Na extremidade carboxi-terminal (extremidade 3') existe, igualmente, uma região não transcrita. Os genes estruturais estão situados na extremidade 5' e codificam as proteínas que integram a partícula vírica. O gene C codifica a proteína da cápside (C). Entre as regiões estruturais e não

estrutural existe uma região hipervariável E1, E2/NS1 que codifica as proteínas do invólucro, zona particularmente importante em mutações. Os genes não estruturais codificam proteínas cuja designação segue a ordem de translação de NS2 a NS5 (LYRA, 2004; IVANOV, 2013). Algumas destas proteínas constituem o sistema enzimático necessário ao crescimento e à replicação virais, e outras têm funções de ligação às células do hospedeiro, desempenhando um papel importante na persistência da infecção (MEDVEDEV et al., 2016). A figura 3 mostra as proteínas estruturais, não estruturais e as atividades enzimáticas requeridas para a clivagem da poliproteína.

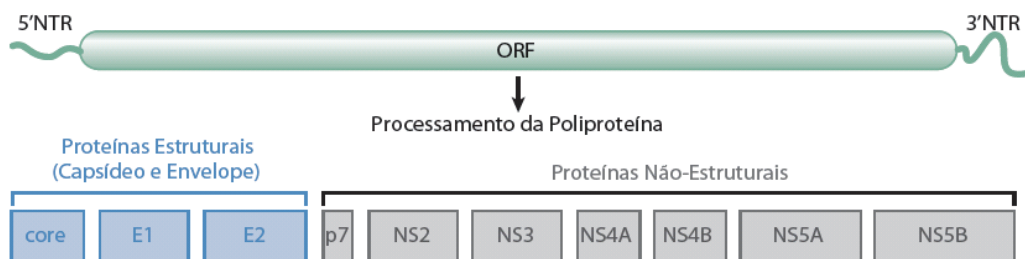


Figura 3 - Representação esquemática da organização genômica do HCV

Fonte: Adaptado de Rice (2011).

Atualmente foram identificados 11 genótipos de HCV (designados 1-11) com vários subtipos distintos (designados a, b, c, etc.) (HASSAN et al., 2015), e seis dos quais são os principais genótipos (1-6) (CHAYAMA & HAYES, 2011). Os genótipos 1-3 têm uma distribuição mundial com os tipos 1a e 1b responsáveis por cerca de 60% das infecções globais (SBARIGIA et al., 2016). O genótipo 1a é mais comumente encontrado no norte da Europa e na América do Norte, enquanto o genótipo 1b é encontrado principalmente no sul e no leste da Europa, bem como Japão. O tipo 3 é endêmico no Sudeste Asiático e é erradicamente distribuído em diferentes países. O genótipo 4 é encontrado em grande parte no Oriente Médio, Egito e África Central, enquanto o tipo 5 é encontrado quase que inteiramente na África do Sul. Os genótipos 6-11 estão distribuídos por toda a Ásia (SBARIGIA et al., 2016).

Uma das características mais importantes do HCV é sua heterogeneidade genética, resultante da pressão imunológica gerada pelo sistema imune humoral do hospedeiro e que determina a caracterização dos diversos genótipos com diferentes subtipos, que têm associação com a severidade da hepatite e influenciam alguns aspectos relativos à infecção como distribuição geográfica, patogenia e resposta ao tratamento (MEHTA et al., 2008).

A genotipagem é de grande importância para o manejo clínico, pois auxilia nas

decisões terapêuticas (RÉ et al., 2007). O genótipo 3 está associado à forma leve da doença, apesar de considerado citopático, tem melhor resposta à terapia antiviral, enquanto o genótipo 1 frequentemente resulta em quadros graves com progressão para cirrose ou CHC, e alta resistência ao tratamento (KUMAR et al., 2002; RÉ et al., 2007)

Um estudo realizado no Brasil sobre a distribuição geográfica dos genótipos, mostrou que o genótipo 1 foi o mais frequentemente encontrado em todas as regiões. No Norte, foi encontrado em 74,1% das amostras, seguido por 66,7% no Nordeste, 66,4% no Sudeste, 57,0% no Centro-Oeste e 51,7% no Sul. O genótipo 2 foi mais prevalente na região Centro-Oeste (11,4), diminuindo no Sul (5,1%), Sudeste (4,7%), Nordeste (3,0%) e Norte (1,2%). A frequência do genótipo 3 foi maior na região Sul (43,2%) do que no Centro-Oeste (31,6%) e Nordeste (30,4%) e significativamente menor na região Sudeste (28,4%). Para a região Norte, por sua vez, a menor frequência de genótipo 3 (24,7%) não foi estatisticamente significativa. Os genótipos 4 e 5 foram raros na população estudada e todos os casos foram do Sudeste, representando 0,3% e 0,2% de todos os casos, respectivamente (CAMPIOTTO et al., 2005). Conforme mostrado na Figura 4, a distribuição de genótipos de HCV foi estatisticamente diferente entre as regiões brasileiras.

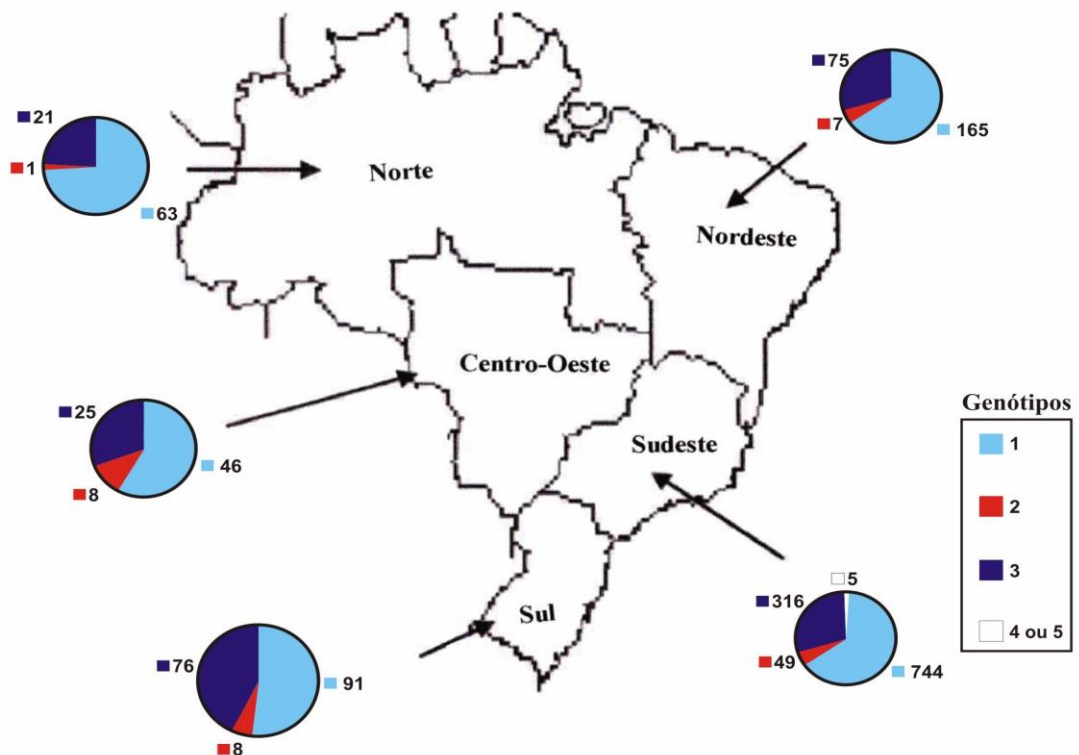


Figura 4 - Distribuição dos principais genótipos do vírus da hepatite C nas diferentes regiões brasileiras.

Fonte: Adaptado de Campiotto et al. (2005).

2.2 Epidemiologia

2.2.1 No mundo

As estimativas indicam que três a quatro milhões de pessoas são infectadas a cada ano, 170 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas e em risco de desenvolver doenças hepáticas incluindo cirrose e câncer de fígado, e 350.000 óbitos ocorrem a cada ano devido a todas as causas relacionadas ao HCV (HANAFIAH, et al., 2013).

De acordo com estimativas recentes, mais de 185 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectados pelo HCV, dos quais 350 000 morrem por ano. Um terço daqueles que se tornam cronicamente infectados desenvolvem cirrose hepática ou carcinoma hepatocelular. Apesar da alta prevalência da doença, a maioria das pessoas infectadas com o vírus não tem conhecimento da sua infecção (WHO, 2014).

A prevalência de hepatite C varia substancialmente em todo o mundo. A prevalência estimada de infecção pelo HCV é mais elevada na Ásia Central e Oriental e nas regiões Norte da África e Oriente Médio em vista das populações maiores na Ásia, as regiões do Sul da Ásia e do Leste Asiático têm, de longe, o maior número de pessoas vivendo com infecção por HCV (WHO, 2014).

O Egito é o país com maior prevalência de HCV no mundo; Em 2008, um inquérito demográfico de saúde Egípcia (EDHS), conduzido em uma grande amostra nacional representativa, estimou a prevalência de anticorpos HCV e RNA HCV, entre os 15-59 anos, de 14,7 e 9,8%, respectivamente. Com base no recenseamento populacional e no EDHS realizado em 2008, estimou-se que mais de 6,8 milhões de pessoas com idades entre 15 e 59 anos tinham anticorpos contra o HCV, dos quais mais de 4,5 milhões de indivíduos tinham infecção ativa por HCV (KANDEEL et al., 2017).

A infecção aguda é geralmente assintomática. Tanto que cerca de 2 a 4 milhões de pessoas podem estar cronicamente infectadas nos Estados Unidos, 5 a 10 milhões na Europa e cerca de 12 milhões na Índia, e muitos não sabem que estão infectados. Cerca de 150.000 novos casos ocorrem anualmente nos EUA e na Europa Ocidental, e cerca de 350.000 no Japão. Destes, 60 a 80% podem progredir para doença hepática crônica, e destes 20% desenvolvem cirrose. Cerca de 5% a 7% dos pacientes podem vir a morrer das consequências da infecção (WHO, 2014).

A hepatite C é um importante problema de saúde pública na Região Europeia, onde aproximadamente 15 milhões de pessoas são cronicamente infectadas com o vírus da hepatite C. As infecções por hepatite B e C levam à 400 mortes na região todos os dias. (WHO, 2015).

Na América Latina, estima-se que 6,8 a 8,9 milhões de adultos estão infectados pelo VHC, dos quais mais de 4 milhões estão no México e no Brasil, que são os únicos países da América do Sul que realizaram pesquisas nacionais de estudos de base populacional. A prevalência global de HCV na América Latina é de 1,5%; Varia de 0,1% -0,9% em Suriname, Chile, Peru, Venezuela, Panamá e em outros países da América Latina para 1,0% -3,4% no Brasil, México e Argentina (KERSHENOBICH D et al., 2011).

A população total infectada com HCV na América Latina em 2010 foi estimada em 7,8 milhões, dos quais 4,6 milhões estão infectados com o genótipo 1 (aproximadamente 70% com os subtipos 1a e 1b) e os genótipos 2a, 2b, 2c e 3a que constituem 25% dos genótipos restantes, enquanto que os outros genótipos 4 a 7 são menos comuns (LOZANO-SEPULVEDA et al., 2015).

2.2.2 No Brasil

No Brasil cerca de 2% da população são considerados portadores crônicos. No período de 1999 a 2015, foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) 289.459 casos confirmados de hepatite C no Brasil, 64,2% foram observados no Sudeste, 24,2% no Sul, 5,6% no Nordeste, 3,2% no Centro-Oeste e 2,7% no Norte (Figura 5). Ao longo dos anos a taxa de detecção de casos de hepatite C reagente no Brasil tem mostrado um aumento, observando o mesmo para todas regiões do país. De 2002 a 2009, a região Sudeste apresentou a maior taxa e, a partir de 2010, a região Sul passou a liderar o ranking. Em quase toda a série histórica, a região Nordeste apresentou a menor taxa de detecção. Em 2015, a taxa de detecção da região Sul foi de 14,1 casos para cada 100 mil habitantes, seguida pelo Sudeste (8,1), Norte (3,5), Centro-Oeste (1,9) e Nordeste (1,2) (BRASIL, 2016).

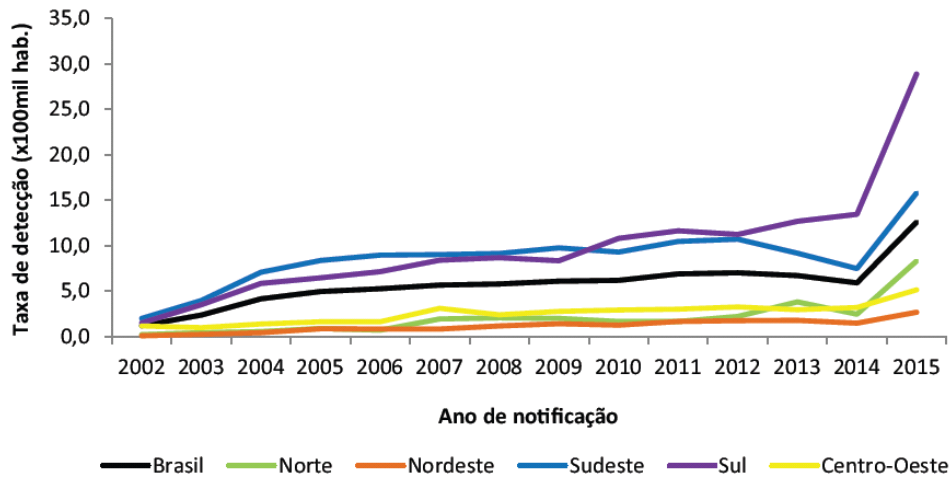


Figura 5 - Taxa de detecção de hepatite C no Brasil segundo região de residência e ano de notificação. 2002 a 2015.

Fonte: Brasil (2016).

A maior causa de morte entre as hepatites virais são pela hepatite C. O número de óbitos devidos a esse agente etiológico vem aumentando ao longo dos anos no Brasil e nas regiões. Entre os anos de 2000 a 2014, foram identificados 42.383 óbitos associados à hepatite C. Neste mesmo período foram identificados, no Brasil, pelo Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) (Sinan/SVS/MS), 56.335 óbitos associados às hepatites virais dos tipos A, B, C e D. Destes, 1,8% foram associados à hepatite viral A; 21,9% à hepatite B; 75,2% à hepatite C e 1,1% à hepatite D (Figura 6) (BRASIL, 2016).

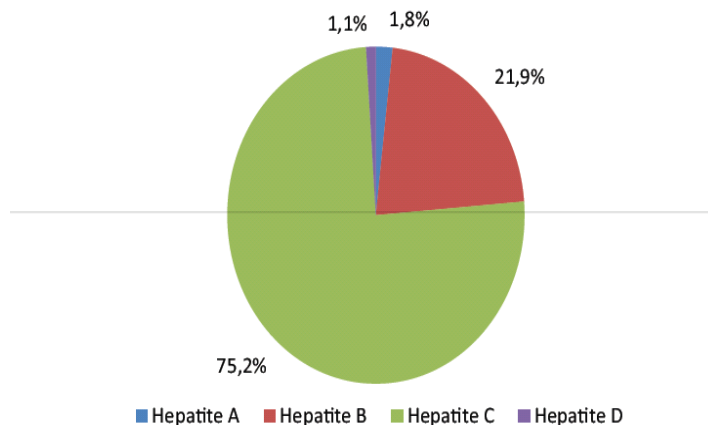


Figura 6 - Distribuição dos óbitos associados às hepatites virais segundo agente etiológico. Brasil, 2000 a 2014.

Fonte: Brasil (2016).

Quanto à provável fonte ou mecanismo de infecção, vale destacar que existe um percentual significativo de casos em que não se conhece a forma de transmissão. Apesar disso, nos casos em que esse dado é conhecido, a maioria verifica-se entre os usuários de drogas, seguidos daqueles que receberam transfusão sanguínea e dos que tiveram relação sexual desprotegida. Em 2015, o percentual de usuários de drogas foi de 26,7%, e o percentual de indivíduos que se infectaram por via sexual foi maior que o de transfundidos, 25,0% e 19,5%, respectivamente (Figura 7) (BRASIL, 2016).

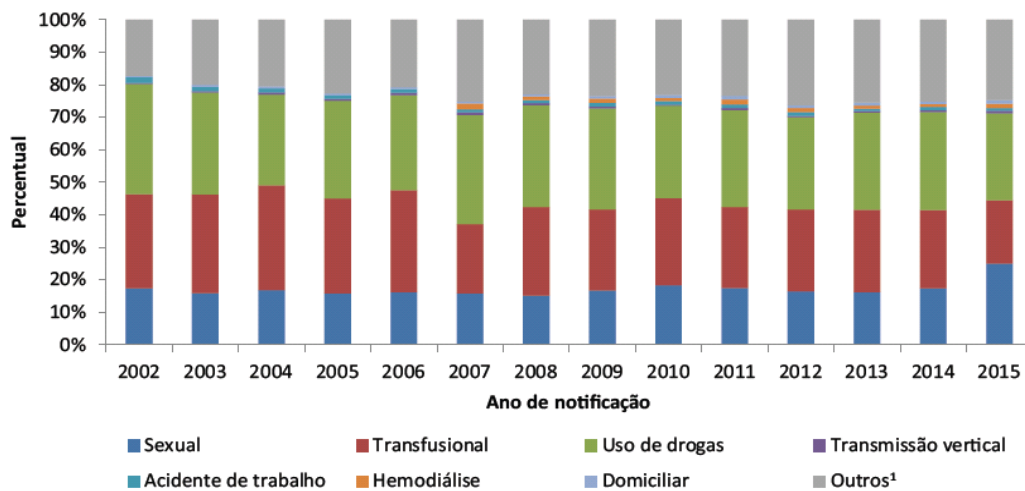


Figura 7 - Proporção de casos de hepatite C segundo provável fonte ou mecanismo de infecção e ano de notificação. Brasil, 2002 a 2015.

Nota: (1) Outros = tratamento cirúrgico + tratamento dentário + pessoa/pessoa + outras formas.

Fonte: Brasil (2016)

2.2.3 Rio Grande do Sul

A elevada incidência detectada no Sul do país pode ser explicada pela heterogeneidade geográfica e / ou racial, bem como especificidades relacionadas a fatores de risco. Num estudo de coorte retrospectivo de 10 anos realizado para determinar a incidência de carcinoma hepatocelular (CHC) em pacientes ambulatoriais com cirrose atendidos no Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, RS, mostrou-se que o vírus da hepatite C e o uso intenso de álcool foram os principais agentes etiológicos da cirrose (APPEL-DA-SILVA, et al, 2016).

Em um estudo realizado em Santo Ângelo, RS, município pertencente a região noroeste do Rio Grande do Sul, mostrou que os genótipos variaram entre 1 e 3, sendo o

genótipo 3 o mais predominante com 55,5% das infecções, seguido do genótipo 1 com 33,1% (BERGMANN et al., 2014)

2.2.4 Município de Uruguaiana

Uruguaiana está situada no extremo ocidental do estado do Rio Grande do Sul, junto à fronteira fluvial com a Argentina e Uruguai. Pertence à Microrregião da Campanha Ocidental, na Mesorregião do Sudoeste Rio-Grandense (PREFEITURA MUNICIPAL DE URUGUAIANA, 2017). Um levantamento bibliográfico realizado no período de 2007 a 2015 e consulta à Secretaria de Vigilância Epidemiológica do município, neste período, 30.678 casos foram notificados no Estado do Rio Grande do Sul e 341 casos em Uruguaiana. A faixa etária mais acometida pela infecção foi de 40 a 59 anos (figura 8).

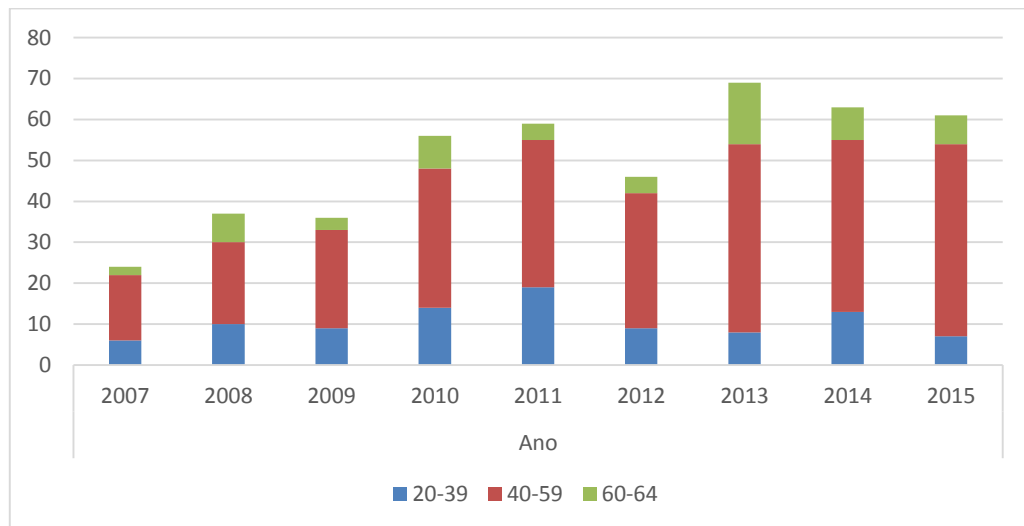


Figura 8 - Casos de hepatite viral C notificados no município de Uruguaiana-RS de 2007 a 2015.

Fonte: A autora

2.3 Diagnóstico

O diagnóstico da hepatite C pode ser realizado na sequência de manifestações clínicas, mas, na maioria das vezes, é feito de forma esporádica, no decurso da investigação de alterações das transaminases ou de um programa de rastreio (GRETCH, 1997; AUGUSTO & LOBATO, 2004).

As hepatites virais constituem um importante problema mundial de saúde pública com grande impacto econômico na sociedade e são causadas por agentes com tropismo pelo tecido hepático (MINAS GERAIS, 2007). O diagnóstico é realizado por meio de testes de triagem, que detectam a exposição ao vírus por meio do marcador anti-HCV, seguido de testes confirmatórios que são usados para verificar, de forma direta, a presença do vírus no organismo (GUPTA et al., 2014).

As duas principais diretrizes a Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL) e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), atualmente recomendam a detecção de anticorpos anti-HCV juntamente com a determinação molecular de HCV-RNA para o diagnóstico da infecção pelo HCV (ZHU; CHEN; 2013). O constante avanço tecnológico na área de diagnóstico permitiu o desenvolvimento de técnicas avançadas de imunoenaios, incluindo o de fluxo lateral, que são atualmente empregadas na fabricação de testes rápidos (TR) (HEIAT et al., 2014)

2.3.1 Testes sorológicos

2.3.1.1 Testes Rápidos

São testes utilizados para a determinação qualitativa do anticorpo anti-HCV, por método imunocromatográfico, usando antígenos sintéticos e recombinantes imobilizados na membrana para identificação seletiva de anti-HCV em amostra mínima de soro ou sangue (BRASIL, 2015).

2.3.1.2 Imunoensaio

São exames sorológicos baseadas na detecção do antígeno viral e/ou anticorpos específicos (SCHEUEUR, 1991). A presença de anti-HCV não define isoladamente a presença de infecção ativa, deve ser interpretada como contato prévio com o HCV (BRASIL, 2011).

2.3.1.3 Testes Moleculares

São testes de amplificação dos ácidos nucleicos, denominados HCV-RNA, que permitem detectar o RNA viral de todos os genótipos e subtipos descritos do HCV,

comprovando a presença do vírus (NAINAN, et al., 2006). Esses são testes confirmatórios recomendados atualmente. Portanto, nem o teste rápido ou imunoensaio determinam a infecção ativa do vírus. O teste de HCV-RNA é indicado para confirmação do diagnóstico de hepatite C, caracterização da transmissão vertical, em casos de acidentes com materiais biológicos e na quantificação do HCV-RNA com o propósito de avaliar o tratamento (BRASIL, 2015).

O diagnóstico sorológico das doenças infecciosas pode ser realizado com, pelo menos, dois testes, um para triagem e um segundo confirmatório. Dois ou mais testes combinados, formando um fluxograma, têm o objetivo de aumentar o valor preditivo positivo (VPP) de um resultado reagente no teste inicial (BRASIL, 2015).

2.3.1.4 Genotipagem

O exame de genotipagem do HCV utiliza testes moleculares baseados em amplificação do RNA viral, capazes de identificar os diversos genótipos, subgenótipos e populações mistas do HCV. A caracterização genotípica apenas complementa a avaliação clínico-laboratorial na definição da estratégia para o tratamento da hepatite crônica (GERMER, 1999).

2.4 Tratamento

2.4.1 Tratamento Combinado

A evolução terapêutica para a hepatite C iniciou-se em meados da década de 1980 quando se testou o primeiro medicamento, verificando a sua atividade contra o vírus denominando-se este de interferon alfa (IFN-alfa). Os IFN-alfa são glicoproteínas naturais produzidas pelas células do sistema imunológico em resposta aos organismos infecciosos e/ou células tumorais. São dotados de ações antiviral, antitumoral, antiproliferativa e imunomoduladoras em vários órgãos e linhas celulares. O IFN-alfa pertence à família das citocina, quando ligada ao receptor, desencadeiam uma cascata de reações intracelulares que ativam vários genes induzíveis pelo INF, levando à síntese de proteínas induzidas por IFN, que parecem inibir a multiplicação do vírus dentro de células individuais (ASSELAH et al, 2010).

O IFN-alfa era utilizado em um protocolo por três vezes, por 24 ou 48 semanas dependendo do genótipo. Foi o primeiro regime terapêutico para hepatite C crônica, mas se alcançava apenas 10 – 20% de taxas de resposta virológica sustentada (RVS). A RVS é definida como ausência do RNA do HCV detectável seis meses após o fim do tratamento, indicando a cura da infecção pelo HCV (VEZALI; et al., 2011). A baixa eficácia da monoterapia com o IFN-alfa levou a realização de ensaios clínicos, com a adição de uma molécula de polietilenoglicol à molécula de IFN-alfa, surgindo o interferon alfa peguilado (PEG-IFN), portanto, prolongando a ação, elevando a velocidade de absorção e aumentando assim o tempo de meia-vida do medicamento. (FRIED et al., 2002; BRASIL, 2011).

Em meados do ano 2000, a ribavirina (RBV), um análogo de nucleosídeo foi associada ao IFN. Os mecanismos propostos para explicar a atividade antiviral da ribavirina foram inibição da inosina monofosfato desidrogenase, efeito supressivo direto da RNA polimerase viral e atividade mutagênica. Além disso, a ribavirina possui efeitos imunomoduladores, que também podem contribuir para sua eficácia (DAVIS et al., 1998). A terapia combinada com o interferon alfa-peguilado (IFN-PEG), e a ribavirina (RBV) tornou-se o tratamento padrão para HCV, que mostrou uma resposta virológica sustentada (RVS) que foi associada principalmente com o genótipo do vírus. A terapia combinada com IFN-PEG e RBV mostrou de forma significativa uma melhora da resposta ao tratamento de pacientes com infecção crônica pelo HCV. (ANSALDI et al., 2014).

A introdução de IFN e RBV no tratamento do HCV proporcionou um avanço significativo na tentativa de modificar o curso natural da doença hepática em pacientes com infecção crônica pelo HCV (SATO et al, 2013). Vários estudos examinaram o efeito desta terapia na incidência de CHC) (MORGAN et al., 2013). Os dados atuais indicam que os pacientes tratados com terapêutica antiviral, que conseguem uma resposta virológica sustentada (RVS), têm uma redução da mortalidade por todas as causas, incluindo a progressão da doença hepática. Além disso, os pacientes com RVS apresentam uma melhora importante na inflamação hepática e fibrose e conseqüentemente uma redução no risco de desenvolver CHC (MORGAN et., 2013; SATO et al, 2013)

O tratamento medicamentoso recomendado no Brasil, pelo Ministério da Saúde, de acordo com os genótipos do VHC, até o ano de 2013, é demonstrado na figura 9.

Genótipos	Tratamento medicamentoso recomendado
1	Associação de interferon peguilado (PEG-IFN) e ribavirina (RBV), durante 48 a 72 semanas.
2 e 3	Associação de interferon (IFN) convencional e RBV, durante 24 semanas. No caso de má resposta ao tratamento com INF convencional os pacientes devem receber tratamento com PEG-IFN.
4 e 5	Associação de PEG-IFN alfa e RBV, durante 48 a 72 semanas.

Figura 9 - Tratamento medicamentoso recomendado de acordo com genótipo da hepatite C crônica, até o ano de 2013.

Fonte: Brasil (2011).

2.4.2 Tratamento atual

Em 2011, os primeiros medicamentos antivirais de ação direta (DAAS), telaprevir e boceprevir, foram aprovados nos Estados Unidos pelo *Food and Drug Administration (FDA)*. Combinado com PEG-IFN e RBV, estes DAAS resultaram em uma taxa de RVS elevada em pacientes com HCV genótipo 1 (ZHU-CHEN, 2013; ANSALDI, et al., 2014; NAKAMOTO, et al., 2015).

Desde 2014, novas alternativas de tratamento com o uso de medicamentos que apresentam ação direta contra o HCV com atividade de inibidores de protease, como o telaprevir e o boceprevir estão sendo utilizados para o tratamento desta infecção com bons resultados. Ambos devem ser utilizados em associação com o PEG-IFN e RBV, constituindo assim uma terapia tripla. Porém, os primeiros estudos reportam a utilização desses medicamentos para indivíduos mono infectados pelo HCV, genótipo 1, com fibrose avançada ou cirrose hepática compensada (BRASIL, 2013). O uso desta nova terapia nos co-infectados somente foi liberado em situações específicas, tendo apresentado resultados bastante favoráveis, devendo ser avaliado os riscos e benefícios desta recomendação (ZOPF et al., 2016). Estes esquemas de terapia tripla têm se mostrado eficazes para doentes previamente tratados que não são respondedores à terapia dupla com PEG-IFN / RBV (MULTIMER, et al., 2014)

Desde a introdução do interferon como monoterapia, até a aprovação do telaprevir e boceprevir em maio de 2011 (baseado em terapias triplas com PEG-IFN e RBV), as possibilidades de cura de pacientes infectados com HCV genótipo 1 têm melhorado,

progredindo de menos de 10% para aproximadamente 70%. Vislumbra-se a cura de praticamente todos os pacientes com hepatite C através de um regime terapêutico totalmente livre do interferon num futuro muito próximo (LANGE, 2014). O desenvolvimento e introdução de novos medicamentos elevaram o índice de cura para até 90%, inclusive para genótipos considerados de difícil tratamento (WHO, 2014; WEBSTER, et al. 2015).

O tratamento da infecção pelo HCV evoluiu ao longo dos anos com as novas opções de medicamentos, acarretando uma diminuição na duração do tratamento e dos efeitos adversos (GOWER et al., 2014). A Figura 10 mostra as mudanças no tratamento da infecção pelo HCV e melhorias na resposta virológica sustentada entre 1990 e 2014.

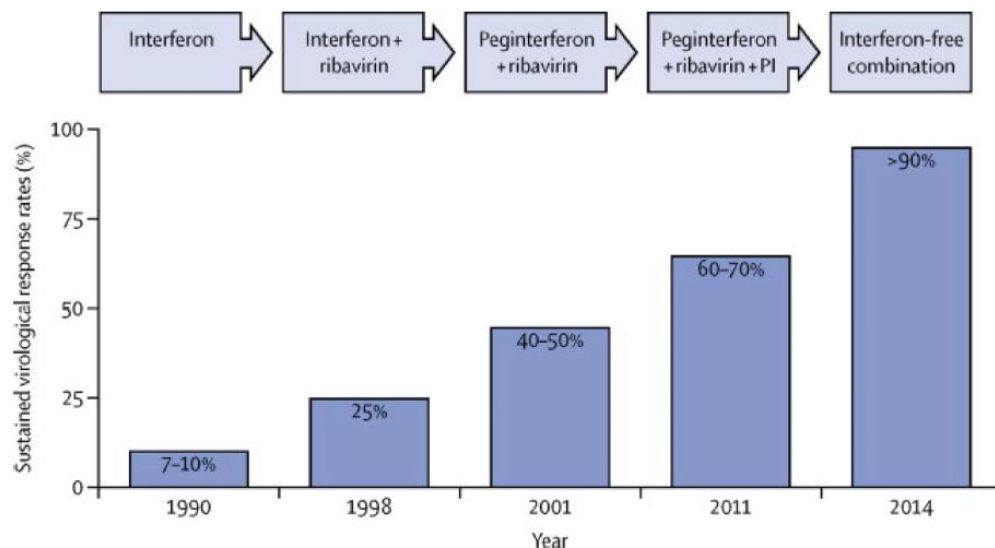


Figura 10 - Mudanças no padrão de tratamento para HCV, e melhorias em número de respostas virológica sustentada.

Fonte: Adaptado de Webster et al., (2015).

A FDA aprovou 10 antivirais de ação direta (DAA, sigla em inglês) para o tratamento do vírus da hepatite C. Estas terapias são combinadas em seis regimes que são dadas em diferentes durações, com ou sem ribavirina, dependendo do genótipo viral, a presença ou ausência de resistência basal associada RVS, e o tipo de paciente. Os RVS podem estar presentes antes da exposição a um fármaco ou podem tornar-se detectáveis durante a exposição a um fármaco. As estirpes resistentes emergentes são a causa mais comum de falha de DAA no tratamento da HCV. Os DAA de segunda geração fornecem uma cobertura superior de variantes resistentes em comparação com a primeira geração membros dessa classe. Eles também podem cobrir uma gama mais ampla de genótipos virais. Numerosos

ensaios clínicos vêm avaliando a segurança e a eficácia dos DAA em uma variedade de populações de pacientes, incluindo aqueles com cirrose, HIV e doença renal (JACOBSON, 2017).

2.5 Estresse Oxidativo

Radical livre (RL) é o termo utilizado para designar espécies atômicas ou moleculares que contenham um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa, tornando-as espécies altamente reativas que agem como eletrófilos capazes de reagir com qualquer composto que esteja próximo, assumindo o papel de agentes oxidantes (GILLHAM et al., 1997, HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Os radicais livres incluem as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), sendo que as ERO são as mais importantes (VALKO et al., 2006).

As principais ERO distribuem-se em dois grupos, sendo, os radicalares: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}), peróxila (ROO^{\bullet}) e alcóxila (RO^{\bullet}); e as não radicalares: oxigênio singleto (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso ($HOCl$). Dentre as ERN incluem-se óxido nítrico (NO^{\bullet}), óxido nitroso (N_2O) e peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), dentre outros (GILLHAM et al., 1997).

As espécies reativas podem ser formadas no organismo de diversos modos. O radical ânion superóxido é o principal produto formado da redução do O_2 por meio da transferência de um único elétron. As ERO são produzidas no metabolismo celular normal. Cerca de 1 a 2% do oxigênio utilizado na respiração mitocondrial é convertido nessas espécies, durante a fosforilação oxidativa (cadeia transportadora de elétrons), que ocorre na membrana interna das mitocôndrias (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999).

Em condições fisiológicas normais as ERO tem um importante papel em várias funções vitais, como por exemplo, na resposta do sistema imune do hospedeiro frente a infecções virais e bacterianas e nos mecanismos de sinalização celular (AGUIRRE & LAMBETH, 2010; GEISZT & LETO, 2004) As ERO causam várias formas de danos teciduais, incluindo danos às proteínas, aos lipídios das membranas celulares, e até mesmo ao DNA. Entre esses efeitos deletérios destacam-se o envelhecimento, apoptose e necrose. Além disso, as ERO estão relacionadas com a patogênese de uma ampla gama de doenças infecciosas e não infecciosas (HALLIWELL & CROSS, 1994). Entretanto, o aumento na sua produção e /ou a redução na sua eliminação gera um desequilíbrio fisiológico caracterizando o estresse oxidativo (FINKEL & HOLBROOK, 2000; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000).

Visando o papel do estresse oxidativo nas diferentes patologias, é importante a ação dos antioxidantes na manutenção da saúde, bem como na prevenção e tratamento de doenças (NIKI, 2010). A produção contínua de RL durante os processos metabólicos ocasionou o desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares de ERO e ERN, bem como para impedir a indução danos oxidativos (SIES, 1997).

O estresse oxidativo tem sido apontado como um fator importante na progressão de diversas patologias de etiologia viral como o vírus da hepatite C, vírus Influenza, vírus da Encefalite Japonesa, vírus da Dengue, vírus HIV, vírus respiratório sincicial e vírus da hepatite B (HBV) (AKAIKE et al., 1996; HOSAKOTE et al., 2009; PAL et al., 2010; OLAGNIER et al., 2014; ZHANG et al., 2014; CAI et al., 2015; KHADEM et al., 2015).

Quando as ERO apresentam-se em níveis baixos, estas ativam a proliferação celular e a maioria dos vírus multiplicam-se melhor em células que estão em mitose. Uma vez que os vírus necessitam de células vivas para sua replicação, as ERO têm um papel chave nesse processo. No entanto, com o progresso da infecção, mais ERO são formadas a fim de conter a multiplicação viral, assim, um aumento na produção dessas espécies promove no estresse oxidativo e seus efeitos tóxicos para o hospedeiro (PETERHANS, 1997).

Nas hepatites virais, como as causadas pelo HCV e HBV, a produção de espécies oxidantes contribui para o aparecimento de carcinoma hepatocelular, um tumor observado em pacientes após anos de inflamação crônica no fígado. Ou seja, o estresse oxidativo contribui para o agravamento das hepatites em pacientes infectados com os vírus supracitados (ABEL et al., 2009).

2.6 Defesas Antioxidantes

Define-se como antioxidante qualquer substância capaz de diminuir ou inibir a oxidação do substrato passível de ser oxidado mesmo estando presente em baixas concentrações. Portanto são compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam a oxidação de macromoléculas ou de estruturas celulares. Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007)

2.6.1 Defesas antioxidantes enzimáticas

O sistema enzimático é a primeira via de defesa do organismo, onde enzimas específicas inativam algumas das ERO. Desta forma, o sistema antioxidante enzimático diminui as ERO e, conseqüentemente o dano às estruturas biológicas. A defesa enzimática envolve a ação cooperativa de três principais enzimas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD), que é encontrada no citosol ou no entorno extracelular (Cu/ZnSOD) e na mitocôndria (MnSOD); o sistema glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) que estão presentes no citosol e peroxissomos, respectivamente (HALLIWELL, 2006).

A CAT é uma hemoproteína citoplasmática conhecida por catalisar a eliminação do H_2O_2 formado após a dismutação do ânion $O_2^{\cdot-}$ pela SOD. Essa enzima tem a capacidade de transformar milhões de moléculas de H_2O_2 em H_2O e O_2 a cada segundo, sem formar radicais livres. A CAT possui uma atividade bastante alta no fígado e nos eritrócitos, relativamente alta nos rins e no tecido adiposo, intermediária nos pulmões e no pâncreas e muito baixa no coração e no cérebro (VALKO et al., 2006; GOYAL & BASAK, 2010).

As enzimas SOD são as mais importantes do sistema antioxidante enzimático. A SOD converte $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 (FRIDOVICH, 1974). Esta enzima pertence ao grupo das metaloenzimas, sendo encontrada principalmente sob duas isoformas, mitocondrial (MnSOD) e citosólica (CuZnSOD). A SOD tem um papel central na desintoxicação das ERO, representando a primeira linha de defesa na eliminação do ânion $O_2^{\cdot-}$ através da catalisação de sua dismutação a H_2O_2 e O_2 (BATINIĆ-HABERLE et al., 2010)

A GPx é uma selenoenzima capaz de reduzir uma grande variedade de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos a H_2O e álcool, utilizando-se de GSH que atua como doadora de elétrons e é convertida a glutathiona oxidada (GSSG). A GSH é regenerada pela glutathiona redutase por intermédio da oxidação de NADPH a NADP⁺ (VANCINI et al., 2012).

2.6.2 Defesas antioxidantes não enzimáticas

O sistema de defesa não enzimático é representado por compostos antioxidantes que podem ter origem endógena, como o caso da glutathiona reduzida (GSH) ou serem obtidas através da alimentação como a vitamina C e polifenóis, e em compostos antioxidantes lipofílicos como a vitamina E (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000).

2.6.2.1 Glutathiona reduzida (GSH)

A GSH (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e ácido glutâmico. Além de ser o principal tiol não-proteico mais abundante nas células dos mamíferos, é também, o principal antioxidante endógeno. Exerce funções essenciais na célula, destacando-se sua função como cofator da família de enzimas glutathiona peroxidase (GPx), em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a dissulfeto da glutathiona (GSSG) (HUBER et al., 2008). Mais de 98% da glutathiona total se apresenta na forma de Glutathiona reduzida (GSH), e o restante na forma de glutathiona oxidada (GSSG). A conversão da GSH em GSSG é catalisada pela enzima glutathiona peroxidase (GPx) durante os períodos de estresse oxidativo (MEISTER & ANDERSON, 1983).

2.6.2.2 Vitamina C

Dentre as vitaminas antioxidantes, a vitamina C (ácido ascórbico) é a mais importante, pois possui um potente poder antioxidante e funciona em ambientes aquosos do corpo. Ela é um antioxidante doador e reage para produzir a estabilização do radical livre ascorbato tricarbonil (Asc \bullet). Além disso, o ácido ascórbico colabora com a vitamina E para regenerar o α -tocoferol nas membranas e lipoproteínas e pode eliminar diretamente radicais $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 , H_2O_2 , OH^{\cdot} (VALKO et al., 2006). Atualmente, o ácido ascórbico é o suplemento vitamínico mais amplamente usado em todo o mundo (KLIMCZAK et al., 2007).

2.6.3 Dano Oxidativo

O dano oxidativo ocorre quando há uma geração aumentada de ERO e diminuição das defesas antioxidantes, o que acarreta na lesão das biomoléculas. O estresse oxidativo favorece a ocorrência de ataques das ERO a componentes celulares, podendo resultar em lesões oxidativas em biomoléculas e diversas estruturas celulares que, se não forem reparadas, alterarão a funcionalidade de células, tecidos e órgãos. As ERRO estão presentes em uma

grande variedade de condições patológicas e acredita-se que funcione como agente patogênico em muitas dessas condições (VICTOR et al., 2009).

Dentre as principais formas reativas de oxigênio o O_2^- apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o OH^\cdot mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O H_2O_2 não é um radical livre por não possuir um elétron desemparelhado na última órbita da eletrosfera. Porém o H_2O_2 , por ser extremamente instável, é fonte de deletérias formas de ROS, como o radical hidroxila, sendo considerado um radical livre (HALLIWELL & GUTTERRIDGE, 2007).

Os seres humanos apresentam um sistema equilibrado entre ERO e as defesas antioxidantes, permitindo assim, que algumas ERO executem funções úteis enquanto reduzem os danos oxidativos (HALLIWELL, 2011). As principais moléculas suscetíveis as ERO são os lipídios presentes nas membranas celulares, as proteínas citosólica e o DNA (GOETZ & LUCH, 2008).

2.6.3.1 Dano a proteínas

As proteínas e as enzimas podem ser atacadas pelas ERO, gerando assim, diversos processos metabólicos. Quando as proteínas são expostas ao ataque de ERO, resultam em múltiplas modificações nestas moléculas. Estas modificações incluem a oxidação dos grupos das cadeias laterais de aminoácidos, fragmentação, modificações na hidrofobicidade e na conformação e formação de novos grupos reativos (como os grupos carbonil). Além disso, este processo pode resultar na perda da estrutura ou atividade enzimática das proteínas (HAWKINS & DAVIES, 2001). A formação e quantificação da proteína carbonil pode ser usada para mensurar a extensão do dano oxidativo. Os grupamentos carbonílicos (CO) são produzidos pela oxidação da cadeia lateral de aminoácidos suscetíveis, como prolina (PRO), arginina (ARG), lisina (LIS) e treonina (TRE), ou pela clivagem oxidativa das proteínas (DALLE-DONNE et al., 2003).

2.6.3.2 Dano a lipídios de membrana

A peroxidação lipídica é uma das consequências mais estudadas do estresse oxidativo. O dano oxidativo a lipídios é um processo complexo que envolve a interação entre ERO com ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), sendo o malondialdeído (MDA) o principal produto. E o resultado da peroxidação lipídica é a perda da fluidez, redução do potencial de membrana,

aumento da permeabilidade e eventual ruptura que conduz à liberação das organelas citoplasmáticas (GOODE et al., 1995; LEFRÈVE, 1998; TSANG & CHUNG, 2009). Este processo resulta em desorganização estrutural e consequente perda da seletividade das membranas, podendo levar à morte celular (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000).

O processo da peroxidação lipídica pode ser dividido em três etapas: (i) iniciação, (ii) propagação e (iii) terminação. Essas etapas são representadas pelas seguintes reações, onde L representa o lipídio como apresentado na figura 11.

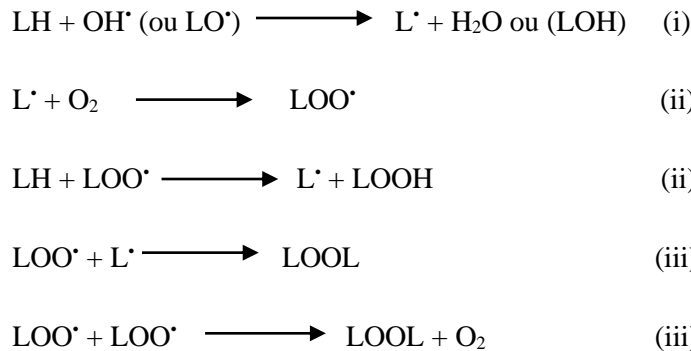


Figura 11 - Etapas da peroxidação lipídica.

Fonte: Adaptado de Ferreira et al. (1997).

2.6.3.3 Dano oxidativo ao material genético

A oxidação direta aos ácidos nucleicos pode levar a dano ao DNA, através da quebra das cadeias ou por ligações cruzadas. Quando esses mecanismos celulares essenciais são afetados, pode ocorrer a morte celular, ou mutações genômicas sendo transmitidas para gerações futuras. Além do mais essas mutações podem gerar efeitos genotóxicos graves e consequentemente, gerar instabilidade genômica e até o aparecimento de câncer (BERAA & MENCK, 2006). O radical OH^{\bullet} é considerado a principal ERO envolvida nos danos ao DNA, reagindo com o DNA por adição de ligações duplas às bases nitrogenadas do DNA e por abstração de um átomo de hidrogênio do grupamento metila da timina e de cada uma das ligações carbono-hidrogênio da 2'-desoxirribose (COOKE et al., 2003). Existem várias técnicas disponíveis para a avaliação do nível de dano ao DNA, sendo uma delas, a frequência de micronúcleos, que são cromossomos ou fragmentos de cromossomos que ficam para trás durante a anáfase e não estão incluídos no núcleo principal, sendo menores, porém morfológicamente semelhantes (SCHMID, 1975; MILIC et al., 2015).

2.7 Estresse Oxidativo na hepatite C

O estresse oxidativo durante a infecção por hepatite C crônica foi detectada já em meados da década de 1990 (IVANOV et al., 2013). O acúmulo de ERO e a geração do estresse oxidativo estão envolvidas no desenvolvimento de uma série de doenças inflamatórias, incluindo a hepatite viral. Pacientes com hepatite C crônica apresentam níveis sanguíneos e hepáticos elevados de pró-oxidantes, níveis reduzidos de antioxidantes, sobrecarga de ferro com aumento da peroxidação lipídica, diminuição da glutathiona hepática e aumento do dano oxidativo ao DNA. A análise proteômica e de *microarray* de biópsias hepáticas revelou um aumento do estresse oxidativo em amostras de portadores de hepatite C (CHAN, 2016).

Em comparação com pacientes de hepatite A, B e E a replicação do vírus da hepatite C (HCV) está associada ao retículo endoplasmático, onde o vírus pode induzir o estresse celular. O dano oxidativo possui um papel importante na fisiopatologia do HCV. O estresse oxidativo é desencadeado quando a concentração de ERO no ambiente extracelular ou intracelular excede as defesas antioxidantes (LOZANO-SEPULVEDA et al., 2015).

Acredita-se que as causas do estresse oxidativo na infecção pelo vírus C incluem vários fatores, como dano mitocondrial, acúmulo de ferro no fígado, resposta inflamatória via imunorreação e ação direta das proteínas virais. O mecanismo exato pelo qual isto ocorre não está totalmente compreendido; no entanto, possíveis mediadores da patogênese da hepatite C como as ERO. Durante a hepatite crônica, a resposta imune induz a produção de ERO e óxido nítrico (NO). O estresse oxidativo induzido por ERO tem uma estreita associação com o processo inflamatório na hepatite C (JAESCHKE et al., 2011, CHOI et al., 2012). Os indivíduos saudáveis possuem mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo como os compostos antioxidantes, a citar: a glutathiona (GSH), vitamina C e vitamina E, e as enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase. No entanto, em portadores da hepatite C crônica, esses mecanismos de proteção parecem estar prejudicados, devido a exposição à longo prazo ao estresse oxidativo durante infecção viral podendo evoluir para hepatocarcinoma (FUJINAGA et al, 2011; TSUKIYAMA, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar o perfil hematológico, bioquímico e de estresse oxidativo em portadores de hepatite C que fazem terapia combinada com interferon alfa peguilado e ribavirina.

3.2 Objetivos específicos

Obter os parâmetros hematológicos e contagem de plaquetas;

Obter os parâmetros bioquímicos de função hepática;

Determinar a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), e glutathione peroxidase (GPx);

Quantificar os níveis de glutathione total (GSH);

Determinar níveis de vitamina C;

Obter os níveis de TAS;

Determinar o dano oxidativo em proteínas;

Determinar o dano oxidativo em lipídios;

Obter o dano oxidativo no material genético (DNA).

PARTE II
MANUSCRITO

**Evaluation of the oxidative stress in hepatitis c carriers that make use of the combined therapy
with pegylated interferon alpha and ribavirin**

Juliana Mezzomo^a, Vinícius Tejada Nunes^a, Mariana Ziolkowsk^{ib}, Raqueli Bittencourt^b, Vanusa
Manfredini^{a*}

Em fase de preparação para submissão para Hepatology



Evaluation of the oxidative stress in hepatitis c carriers that make use of the combined therapy with pegylated interferon alpha and ribavirin

Juliana Mezzomo^a, Vinícius Tejada Nunes^b, Mariana Ziolkowsk^c, Raqueli Bittencourt^d, Vanusa Manfredini^{e*}

Affiliation

^a Email: mezzomoj@yahoo.com.br, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

^b Email: vinciustejada@hotmail.com, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

^c Email: miz.poa@gmail.com, Secretary of health of the municipality of Uruguaiana - Rio Grande do Sul, Brazil.

^d Email: r_bitt@hotmail.com, Secretary of health of the municipality of Uruguaiana - Rio Grande do Sul, Brazil.

^e Email: vanusamanfredini@unipampa.edu.br, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

* Correspondence should be addressed: Vanusa Manfredini, Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiana, Laboratório de Hematologia e Citologia Clínica, BR 472, Km 585, Uruguaiana, RS, Brazil, CEP: 97500-970. Tel.: (55) 3413-4321. Fax: (55) 3414-1484. E-mail address: vanusamanfredini@unipampa.edu.br

ABSTRACT

Viral hepatitis is currently a relevant public health issue in Brazil and the world; it is ubiquitous, reaching several segments of the population and causing severe morbidity and mortality. Hepatitis C has a high impact on global public health. Recent studies suggest the involvement of oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C and hepatocellular carcinoma. Oxidative cellular damage plays an important role in the pathophysiology of hepatitis C virus (HCV). Oxidative stress is triggered when the concentration of oxygen species in the extracellular or intracellular environment exceeds the capacity for antioxidant defense. The exact mechanism by which this occurs is not fully understood, and immune hepatic damage, direct cytotoxic damage mediated by different viral products, and oxidative stress have been implicated in the pathogenesis of hepatitis C. The diagnosis of HCV infection is based on clinical, laboratory, and histological data. The standard treatment for viral hepatitis C (HCV) during the last few decades has been combination therapy with alpha-pegylated interferon (PEG-IFN) and ribavirin (RBV), a guanosine analog that disrupts viral RNA metabolism. The treatment of chronic forms is based on this combination of drugs, for a period of 24–48 weeks, depending on the viral genotype found. In recent years, the involvement of oxidative stress in the progression of HCV has been demonstrated, and the immune response increases the production of reactive oxygen species. However, little is known about the involvement of oxidative stress in HCV patients on combined treatment with PEG-IFN and RBV. Thus, the objective of this study was to determine the hematological, biochemical, and oxidative stress profiles in HCV patients who used combination therapy with PEG-IFN and RBV pegylated interferon alfa and ribavirin. A total of 43 patients with HCV were recruited at the referral service in the city of Uruguaiana, and venous blood was collected. The hemogram and biochemical parameters were obtained from the patients' charts, and the parameters of oxidative stress were determined by classical methodologies. The results show that HCV patients had decreased platelet counts and hemoglobin levels. However, they had a significant increase in liver function markers, and the activities of glutamic oxalacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) were reestablished after the combined treatment. Enzymatic and non-enzymatic defenses were decreased in the HCV group relative to the control group, and combined antiviral therapy sometimes reversed these parameters. Oxidative damage to biomolecules was already increased in these carriers, and combined treatment improved these parameters, but in the control group, levels remained unchanged. *Conclusion:* Thus, the results suggest that HCV carriers have increased oxidative stress at the time of diagnosis, and combined treatment seems to improve this condition.

Keywords: Viral hepatitis, oxidative damage, combination therapy, antioxidant defenses, pathophysiology

1 Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major public health problem because of its increased incidence in the world population. ⁽¹⁾ HCV has a high propensity to establish chronic infection. In the long run, this can lead to advanced liver fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (HCC). Consequently, HCV is the most common indication for liver transplantation in the world. ⁽²⁾ According to recent estimates, more than 185 million people worldwide have been infected with HCV, of which 350,000 die each year, and the number of people who are unaware of their condition is significant. ⁽³⁾

HCV is an RNA virus of the Flaviviridae family, genus *Hepacivirus*, which was initially isolated in the serum of a non-A non-B hepatitis virus in 1989. ⁽⁴⁾ HCV is characterized by high genetic variability. ⁽⁵⁾ Currently, HCV is classified into 11 genotypes (designated 1–11), which differ in their nucleotide sequence, 6 of which are the major genotypes (1–6). ^(6,7) Genotypes show distinct patterns of distribution, reflecting differences in epidemiology, including modes of transmission and ethnic variability. Genotypes 1, 2, and 3 are universally distributed, affecting most of the cases in the world, whereas the other genotypes are limited to more specific geographical areas. ^(8,9) In Brazil, a higher prevalence of genotype 1 has been observed, followed by 3 and 2. ⁽¹⁰⁾ HCV is transmitted through exposure to blood and infected blood products. HCV infection can be spread through blood transfusion, intravenous drug use, sex, surgery, and tattooing. ⁽¹¹⁾

Seropositivity indicates previous contact with the HCV but does not indicate how long ago exposure occurred. A diagnosis of acute infection can only be made with documented serological reversal. Chronic infection should be confirmed by qualitative HCV-RNA research. ⁽¹²⁾ The standard treatment for hepatitis C in recent decades has been combination therapy with alpha-pegylated interferon (PEG-IFN), which is a cytokine that composes the innate human host response with ribavirin (RBV), a guanosine analog that interrupts viral RNA metabolism. Treatment of the chronic forms was based on the combination of interferon or PEG-IFN with RBV, for a period of 24–48 weeks, depending on the genotype found, obtaining a clearance rate of approximately 80% for viral genotypes 2 and 3 and approximately 40% for genotype 1. ^(13,14)

However, studies have suggested the involvement of oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C and HCC. Oxidative stress during chronic hepatitis C infection was detected as early as the mid-1990s. ⁽¹⁵⁾ It is believed that the causes of oxidative stress in HCV infection include several factors, such as mitochondrial damage, iron accumulation in the liver, inflammatory responses via immunoreaction, and the direct action of viral proteins. The exact mechanism by which this occurs is not fully understood; however, reactive oxygen species (ROS) are possible mediators of the

pathogenesis of hepatitis C. During chronic hepatitis, the immune response induces the production of ROS and nitric oxide (NO). Oxidative stress induced by ROS has a close association with the inflammatory process in hepatitis C. ^(16,17) Healthy individuals have protective mechanisms against oxidative stress, such as antioxidant compounds, namely glutathione (GSH), vitamin C, and vitamin E, and antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase. However, in chronic hepatitis C patients, these protective mechanisms seem to be impaired due to long-term exposure to oxidative stress during viral infection and can progress to hepatocarcinoma. ^(18,19) To date, there are no scientific studies showing the involvement of oxidative stress throughout the combined treatment. Therefore, the objective of this study was to determine oxidative stress parameters in patients with viral hepatitis C receiving combination treatment.

2. Materials and Methods

2.1 Patient selection

2.1.1 Inclusion criteria

The study was carried out with patients with viral hepatitis C enrolled in the Viral Hepatitis Sector of the Municipal Department of Uruguaiana, RS, Brazil which is linked to the Screening and Follow-up Center (CTA) and Specialized Service in sexually transmitted diseases (STD)/AIDS and Viral Hepatitis (SAE) Epidemiological Surveillance (EV). Control subjects were randomly enrolled with the registry of the Municipal Health Department of the city. All study participants signed an informed consent form.

2.1.2 Exclusion criteria

Patients with other associated systemic pathological conditions, such as infections or neoplasms and autoimmune disorders, were excluded from this study; patients with clinical or biological data indicating chronic kidney disease and those individuals who did not meet the criteria set forth in the subsection above were also excluded.

2.2 Characterization of the sample

The total sample in this study was composed of 93 participants: 50 healthy individuals to be included in the control group and 43 patients with HCV. All subjects in the control group were negative for HCV, HBV, HIV, HBsAg, total anti-HBc, and anti-HCV and had normal serum transaminase

concentrations. The HCV group was divided into four groups: diagnosis (free of combined pharmacological treatment), time 1 (onset of combined treatment), time 2 (half of the combined treatment), and time 3 (final of the combined treatment). Treatment time was established according to the degree of hepatic impairment and the number of pegylated interferon alpha applications performed in the week of 08/31/15 to 04/09/15.

Pharmacotherapeutic follow-up was carried out at the Center for the Application and Monitoring of Injectable Drugs (CAMMI), a partnership between the state and municipality, which operates according to Administrative Rule 554/2005 and is the Reference Center for the Region of the Western Border (RS), serving patients with Hepatitis C according to the Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines for Viral Hepatitis C and Co-infections (Ordinance 221/2011) through the reception and integral follow-up of patients during treatment.

The data to establish the sociodemographic profile of patients with viral hepatitis C from the study were obtained from patients' charts at the CAMMI (Center of Application and Monitoring of Injectables) (Supplement A).

For the accomplishment of this study, 5 groups were established as described below:

Control group (n = 50): healthy individuals

Diagnosis of HCV (n = 10): HCV carriers

Time 1 (n = 10): 1/3 of the treatment

- 24 weeks of treatment: 1-8 applications

- 48 weeks of treatment: 1-16 applications

Time 2 (n = 11): 2/3 of the treatment

- 24 weeks of treatment: 9-16 applications

- 48 weeks of treatment: 17-32 applications

Time 3 (n = 12): 3/3 of treatment

- 24 weeks of treatment: 17-24 applications

- 48 weeks of treatment: 33-48 applications

2.3 Parameters analyzed

2.3.1 Hematological and biochemical profiles

The hematological parameters such as hemoglobin dosage and platelet counts and biochemical parameters of liver function (GOT, GPT, GGT, and bilirubin) were obtained from the patient's medical records at the Center for the Application and Monitoring of Injectable Medications (CAMMI).

2.3.2 Evaluation of the parameters of oxidative stress and antioxidant defenses

Venous blood samples (10 mL) were collected in EDTA tubes for determination of oxidative stress parameters.

2.3.2.1. Antioxidant defenses

Catalase activity (CAT) was determined according to the method described by Aebi.⁽²⁰⁾ The antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) were determined using RANSOD[®] and RANSEL[®] commercial kits, respectively (Randox Laboratories, UK). The quantification of GSH was determined by the method described by Akerboom and Sies.⁽²¹⁾ Plasma vitamin C levels were quantified by spectrophotometry according to Jacques-Silva.⁽²²⁾ Total antioxidant status (TAS) was obtained using the RANDOX[®] kit.

2.3.2.2. Oxidative damage

Oxidative damage to plasma proteins was determined by quantification of carbonyl groups according to Levine.⁽²³⁾ Lipid peroxidation was quantified in plasma by measurement of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) according to the methodology described by Ohkawa.⁽²⁴⁾ Micronucleus frequency was determined in peripheral blood leukocytes according to the methodology described by Schmid⁽²⁵⁾ All assays were performed in triplicate.

2.4 Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation. Two-way ANOVA analysis was used followed by Bonferroni test, with a significance level of $p < 0.05$. The statistical software GraphPad Prism 5.0 Free was used, available at <http://www.graphpad.com/demos/>.

2.5 Ethical aspects

The study was approved by the Research Ethics Committee of Unipampa (protocol number 001/2012) and authorized by the secretary of health of the municipality of Urugaiana, RS. The researchers followed the recommendations of resolution 466/12 of the National Health Council of the Ministry of Health.

3 Results

The socio-demographic profile of patients with viral hepatitis C study participants is presented in Table 1. Of the 43 patients with viral hepatitis C recruited for the study, 33 (76.74%) were male and 10 (23.56%) were female. Most of the patients (60.46%) were over 40 years of age and had no primary education (60.46%), none of the participants were institutionalized (100%), and none had any other Sexually Transmitted Disease (STD). The average family income was one (01) minimum wage (62.79%).

Combined treatment causes many side effects, such as chronic non-communicable diseases. Of the 43 participants, 9 (20.93%) reported depressive symptomatology and 19 (48.83%) did not present any other type of illness. It has also been reported that 13 (30.23%) of these patients used medication continuously.

The HCV genotypes 1, 1a, 1b, 2, and 3 were found among the 43 samples. The general frequencies were 16 (37.20%) for genotype 1b, 14 (32.56%) for genotype 3, 7 (16.28%) for genotype 1a, and 5 (11.63%) for genotype 1. Genotype 2 was found in only one participant (2.32%). In this study, 35 (81.40%) participants had a high viral load (>200,000 copies/mL) and 8 (18.60%) had a low viral load (<200,000 copies/mL).

TABLE 1. Socio-demographic profile of viral hepatitis C bearers in the study.

Variable	Classification	Nº	%
Age	< 40 years	17	(39,54)
	> 40 years	26	(60,46)
Gender	Male	33	(76,74)
	Female	10	(23,56)
Family income (minimum wage)	Until 1 s.m	27	(62,79)
	More de 1 s.m.	16	(37,21)
Institutionalized	Yes	0	(0)
	No	100	(100)
Education	Incomplete 1 st degree	26	(60,46)
	Complete 1 st degree	8	(18,60)
	Incomplete 2 st degree	3	(6,97)
	Complete 2 st degree	6	(13,95)
Carriers of other STDs	Sífilis	Neither	(0)
	HIV	Neither	(0)
	Hepatitis B	Neither	(0)
Non-transmissible diseases	Diabetes mellitus	4	(9,30)
	Arterial hypertension	8	(18,60)
	Pulmonary disease	2	(4,65)
	IAM	2	(4,65)
	Dyslipidemia	1	(2,33)
	Angina	4	(9,30)
	Ulcer	7	(16,28)
	AVC	2	(4,65)
	Depression	9	(20,93)
	Anemia	4	(9,30)
Medications for continuous use	Neither	21	(48,83)
	Yes	13	(30,23)
	No	30	(69,77)
Genotype	1	5	(11,63)
	1a	7	(16,28)
	1b	16	(37,20)
	2	1	(2,32)
	3	14	(32,56)
Viral load	Below (< 200.000 IU/L)	8	(18,60)
	Above (> 200.000 IU/L)	35	(81,40)

The hematological parameters are expressed in Table 2. There was a statistically significant ($p < 0.05$) decrease in the number of platelets and hemoglobin levels in patients with viral hepatitis C at the time of diagnosis relative to the control group. Throughout the combined treatment, no significant change was observed.

Hepatic function markers (GOT, GPT, GGT and total bilirubin) showed a statistically significant increase ($p < 0.05$) in HCV patients relative to those in the control group. During the treatment, hepatic function (GOT and GPT) improved in HCV bearers at the end of the combined treatment (time 3) relative to the moment of diagnosis.

TABLE 2. Hematologic and biochemical profile of patients with viral hepatitis C at the time of diagnosis and along the combined treatment with ribavirin and pegylated interferon alpha.

Parameter	Control	HCV Diagnosis	Time 1	Time 2	Time 3
Hemoglobin (g/dL)	16,4±1,5	12,5±1,3*	12,7±2,5	12,8±1,9	12,8±2,3
Platelet ($10^3/\text{mm}^3$)	345,1±85	197,5±70*	162,4±60	167,5±55	175,2±67
GOT (U/L)	45,4±12,5	109,7±13,5*	76,18±14,5	72,8±12,3	59,4±13,7#
GPT (U/L)	33,2±11,5	88,7±10,7*	74,8±9,8	69,6±8,6	45,3±10,2#
GGT (U/L)	55,6±9,6	91,1±6,2*	85,2±5,6	83,1±4,8	81,0±5,6
Total Bilirubin (mg/dL)	0,7±0,3	2,1±0,5*	1,0±0,2	0,9±0,2	0,8±0,2

* $p < 0,05$ in relation to the control group

$p < 0,05$ in relation to the HCV group free of combined treatment

The activities of the antioxidant enzymes CAT, SOD, and GPx are shown in Figure 1. The activity of the antioxidant CAT enzyme (Figure 1A) showed a statistically significant decrease ($p < 0.05$) in the HCV group (free of combined treatment) relative to that of the control group. Throughout the combined treatment (PEG-INF and RBV), there was a statistically significant increase ($p < 0.05$) in CAT activity relative to that in the HCV group, and CAT activity remained elevated during the whole combined treatment.

SOD (Figure 1B) showed a statistically significant decrease ($p < 0.05$) in the HCV group (free of combined treatment) compared with the control group. Throughout the combined treatment, SOD activity increased significantly ($p < 0.05$), showing higher enzymatic activity than the control group at the end of the treatment (time 3).

The activity of GPx (Figure 1C) presented a statistically significant decrease ($p < 0.05$) in the group diagnosed with HCV relative to that in the control group. The activity of this enzyme did not change at treatment times 1 and 2. However, there was a statistically significant increase ($p < 0.05$) at treatment time 3 relative to that in patients diagnosed with HCV.

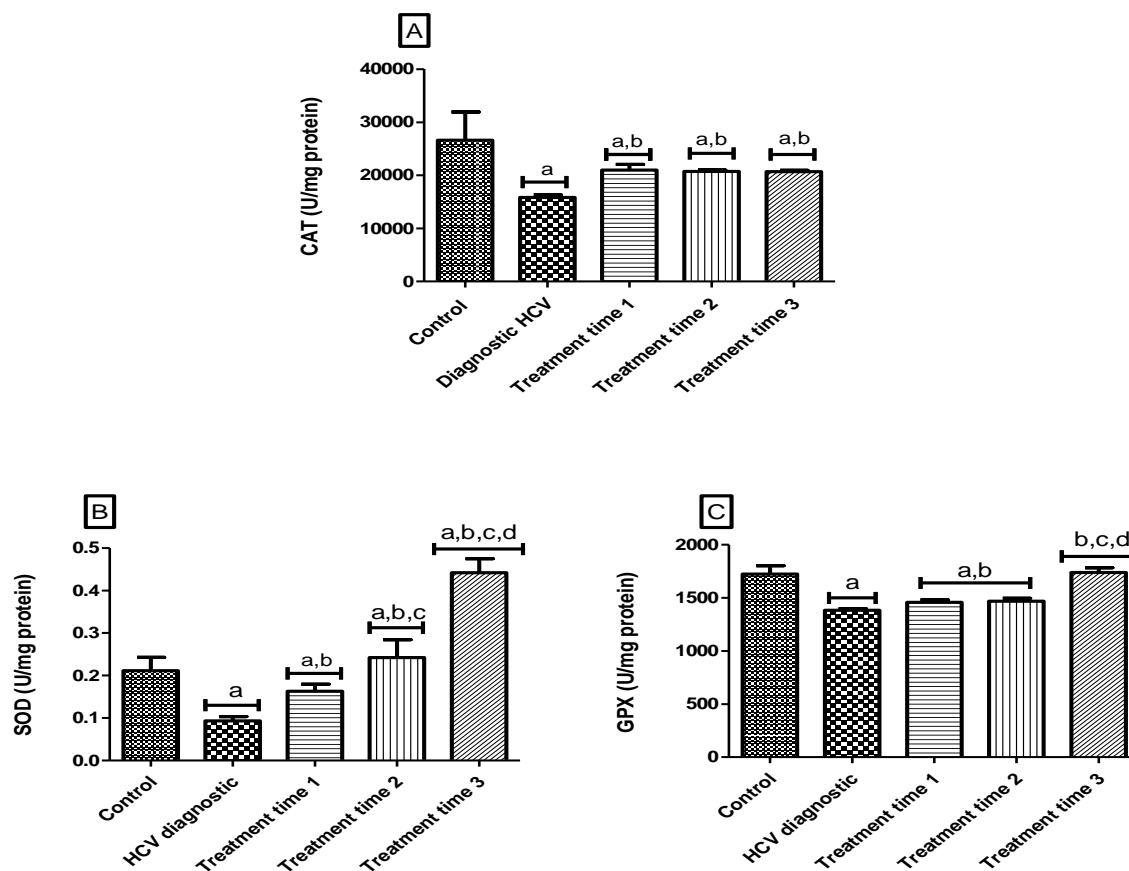


FIG. 1. Activity of the antioxidant enzymes of the study participants. 1A: CAT activity, 1B: SOD activity and 1C: GPx activity. ^a Significantly different of the control group ($p < 0.05$); ^b Significantly different of the HCV diagnostic ($p < 0.05$); ^c Significantly different of the treatment 1 ($p < 0.05$); ^d Significantly different of the treatment 2 ($p < 0.05$).

The profile of the non-enzymatic defenses is presented in Figure 2. GSH levels (Figure 2A) presented a statistically significant decrease ($p < 0.05$) in the HCV group relative to those in the control group. There was no change in this parameter at treatment times 1 and 2. However, at the end of the combined treatment (time 3) GSH concentrations were significantly increased relative to those in the control group.

The levels of vitamin C (Figure 2B) presented a statistically significant decrease ($p < 0.001$) in the group of patients diagnosed with HCV relative to those in the control group. During the combined treatment, vitamin C levels were reestablished; however, there was no change in the profile between treatment times 1, 2, and 3.

The TAS is shown in Figure 2C. In the group of patients with HCV, TAS levels decreased significantly ($p < 0.05$) relative to those in the control group. At times 1 and 2 of the combined treatment, there was no statistically significant difference. However, at treatment time 3, a statistically significant ($p < 0.05$) increase in TAS was observed, showing levels similar to those in the control group.

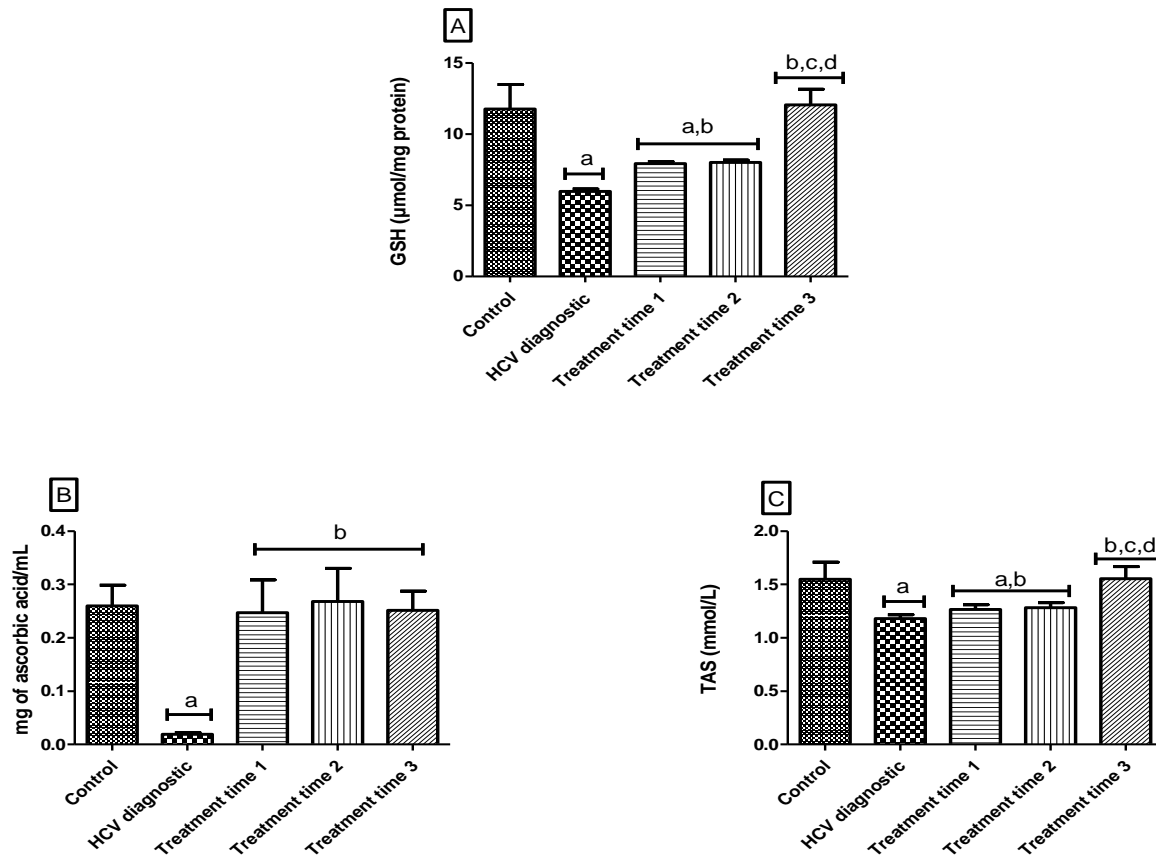


FIG. 2. Non-enzymatic defenses of study participants. 2A: Glutathione total, 2B: Vitamin C and 2C: Total antioxidant status. ^a Significantly different of the control group ($p < 0.05$); ^b Significantly different of the HCV diagnostic ($p < 0.05$); ^c Significantly different of the treatment 1 ($p < 0.05$); ^d Significantly different of the treatment 2 ($p < 0.05$).

Oxidative damage in biomolecules is shown in Figure 3. Levels of carbonylated proteins (Figure 3A) showed a statistically significant increase ($p < 0.05$) in the group diagnosed with HCV relative to those in the control group. Throughout the combined treatment, a statistically significant decrease ($p < 0.05$) in the carbonylation levels was observed.

Plasma concentrations of TBARS (Figure 3B) show a statistically significant increase ($p < 0.05$) in the group diagnosed with HCV compared with those in the control group. During treatment, a

reduction ($p < 0.05$) in lipid peroxidation at treatment times 2 and 3 was observed relative to that in the group of patients diagnosed with HCV.

Figure 3C shows the frequency of micronuclei. A statistically significant ($p < 0.05$) increase in the frequency of micronuclei in the HCV group and in combination treatment (times 1, 2, and 3) was observed relative to that in the control group. These results suggest that combined treatment with PEG-INF and RBV does not have mutagenic activity.

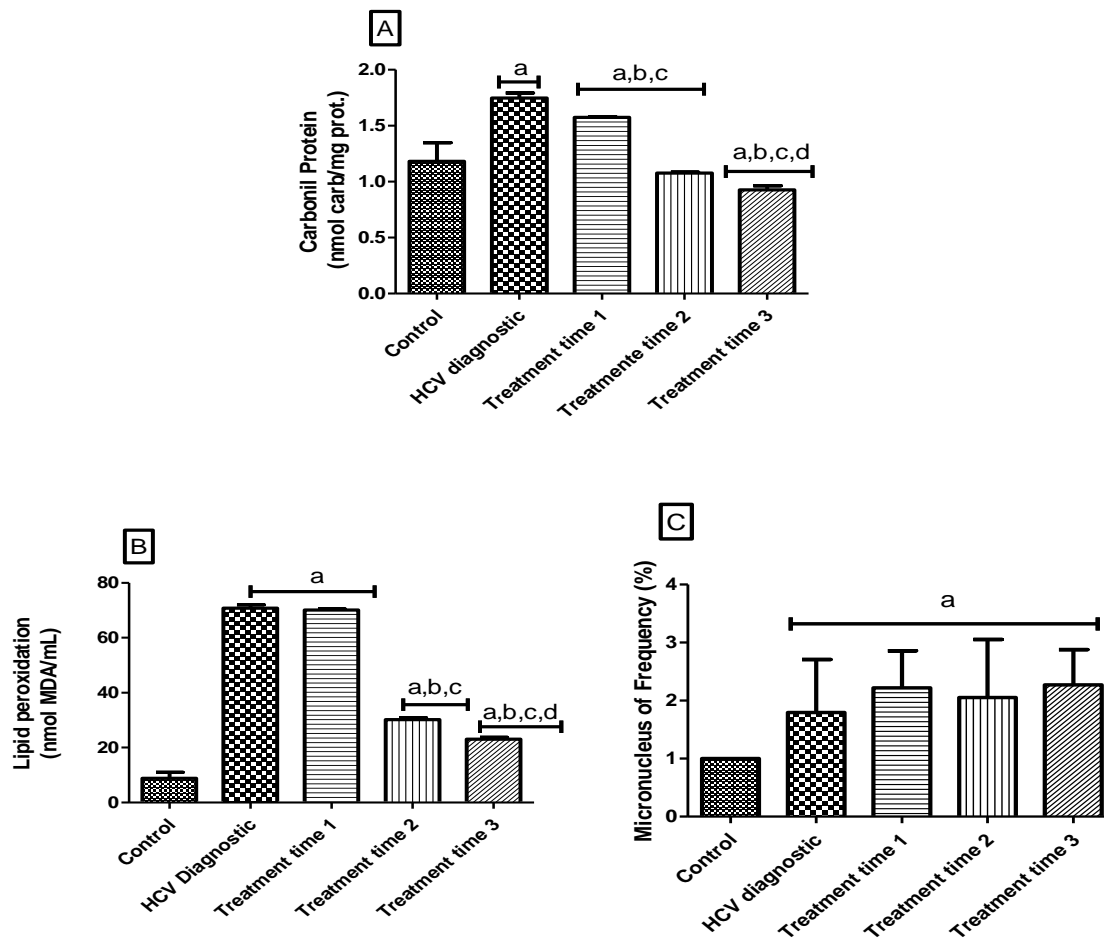


FIG. 3. Oxidative damage to biomolecules of study participants. 3A: Carbonylation of proteins, 3B: MDA levels e 3C: Frequency of micronucleus. ^a Significantly different of the control group ($p < 0.05$); ^b Significantly different of the HCV diagnostic ($p < 0.05$); ^c Significantly different of the treatment 1 ($p < 0.05$); ^d Significantly different of the treatment 2 ($p < 0.05$).

4. Discussion

In this study, a predominance of HCV in males older than 40 years was observed. In agreement with a recent review ⁽²⁶⁾ also showed that male HCV patients were more prevalent than females and 71.7% were older than 40 years. These findings are also in agreement with data from the Epidemiological Bulletin of Viral Hepatitis (2016), confirmed cases: since 1999, 152,712 cases of hepatitis C have been reported in Brazil, with 89,858 (58.8%) cases among men and 62,796 cases (41.2%) among women. Although the number of cases is higher among men than among women, this proportion has been decreasing over the years. ⁽²⁷⁾

Several studies report that PEG-INF and RBV therapy causes psychiatric side effects, with depressive symptomatology being the most prevalent. ⁽²⁸⁾ In this study, it was observed that among the non-communicable diseases, depression was one of the most cited among patients with HCV throughout the combined therapy. A study ⁽⁷⁾ involving HCV patients using PEG-INF-2a, PEG-INF-2b, and RBV antiviral therapy, showed that cases of depression increased significantly in both treatment groups over time. Another study ⁽²⁹⁾ also showed that PEG-IFN is associated with a high incidence of depressive symptoms, corroborating the findings in the literature.

Analyzing the characterization of the samples regarding the distribution of genotypes in HCV carriers, a predominance of the type 1 genotype was observed, corroborating a study ⁽³⁰⁾ in which they demonstrated that in Brazil, genotype type 1 is predominant in all states. A study conducted in 98 countries showed the distribution of genotypes. Overall, genotype 1 (G1) was the most common (46%), followed by G3 (22%), G2 (13%), and G4 (13%). ⁽⁸⁾

Changes in routine laboratory test results are often seen in patients with HCV. In this study, there was a significant decrease in platelet and hemoglobin levels in HCV patients (untreated) compared with the control group, in agreement with recent study ⁽³¹⁾ Another study ⁽³²⁾ also revealed a reduction in platelet count and hemoglobin levels in the same PEG-INF and RBV-treated patients. This myelosuppressive effect is due to the action of interferon, since this drug interferes in medullary hematopoiesis. However, the anemia observed during combined treatment is mainly associated with ribavirin-induced hemolytic anemia. ⁽³³⁾

Hepatic function markers such as GOT and GPT showed a significant increase in patients diagnosed with HCV compared with those in the control group. A similar study comparing healthy subjects and hepatitis C carriers before and after combined treatment also found a significant increase in GOT and GPT liver enzymes among HCV patients before treatment and a decrease after treatment.

This suggests that the action of antiviral therapy decreased HCV replication, consequently decreasing liver tissue injury. In this study, total bilirubin values showed a statistically significant increase in the group diagnosed with HCV when compared with those in the control group, but it was not significant relative to the other groups of patients who used combination therapy with PEG-INF and RBV. ⁽³⁴⁾ Another study ⁽³⁵⁾ also demonstrated significant changes in total bilirubin values in all patient groups when compared with those in the control group, but there were no significant changes in mean serum bilirubin levels between groups of patients.

Studies have suggested the involvement of oxidative stress associated with the pathogenesis of HCV. ^(17, 34) In this study, the enzymatic activity of CAT showed a significant decrease in the HCV group relative to that of the control group. These results agree with the findings ⁽³⁶⁾ that showed that the mean CAT activity of children with HBV and HCV was statistically lower than that of the control group. A decrease in SOD and GPx activity in HCV patients was also observed relative to that in the control group. Was demonstrated ⁽³⁸⁾ that SOD activity was significantly decreased in HCV patients before combined treatment when compared with that in healthy subjects. This result may indicate a decreased antioxidant capacity in patients with chronic viral hepatitis C.

The reduction in SOD and GPx activities reflects a decrease in the antioxidant defense power of HCV carriers. It can be suggested that the increase in lipid peroxidation (TBARS levels) also observed in this study may be caused by the inflammation from the virus, and the low levels of antioxidant defense may be an early marker of oxidative stress. The lipid peroxides formed can be chemotactic for neutrophils, causing an increase in the inflammatory process, which further boosts liver-oxidant-mediated injury. ⁽³⁷⁾

Glutathione (GSH) is a more abundant antioxidant tripeptide within the cell and plays an important role in the defense against cell damage induced by oxidative stress. In cells, GSH is present mainly in its reduced form ⁽³⁸⁾ In the present study, we have shown that GSH levels are decreased in erythrocytes of patients with chronic HCV. These results are in agreement with another findings that ⁽³⁹⁾ showed a significant decrease in the concentration of GSH in groups of patients diagnosed with hepatitis C with and without treatment, before supplementation with antioxidants.

In the present study, the group diagnosed with HCV showed a significant increase in the levels of carbonylated proteins and plasma concentrations of MDA relative to those in the control group. These findings corroborate the studies ⁽³⁴⁾ which showed that serum MDA was significantly increased in HCV patients before treatment when compared with that in healthy subjects. Therefore, the present results confirm the involvement of oxidative stress as part of the pathophysiology of HCV.

The pathogenic mechanisms by which HCV causes cellular damage remain unclear, although it has been suggested that oxidative stress may play a pathogenic role in this infection. Chronic hepatitis C patients exhibit an increased production of TNF- α , a cytokine that can produce oxidative stress by stimulating the generation of ROS.⁽⁴⁰⁾ Although interferon and ribavirin are not antioxidants, their antiviral ability may reduce viral load and inflammation and perhaps, through this mechanism, may reduce the oxidative stress induced by the virus.

This study showed a significant increase in the frequency of micronuclei in the group diagnosed with HCV relative to that in the control group, in agreement with the study ⁽⁴¹⁾ in which lymphocytes from patients chronically infected with HBV or HCV presented greater chromosomal instability, characterized by an increase in the frequency of micronuclei. During the combined treatment, there was no significant difference, suggesting that combined treatment with PEG-INF and RBV did not present mutagenic activity.

5 Conclusions

Based on the results of this study, we suggest that patients with viral hepatitis C present alterations in liver function markers, and a marked increase in oxidative stress. This may be evidenced by the reduction of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses and increased oxidative damage in biomolecules. The combined treatment could sometimes restore the levels of some parameters of oxidative stress.

Conflicts of interest statement

All authors report no conflict of interest.

REFERENCES

- 1) WEBSTER, D. P.; KLENERMAN, P.; DUSHEIKO, G. M. Hepatitis C. **The Lancet**, v. 385, n. 9973, p. 1124-1135, 2015.
- 2) THOMAS, D. L. Global control of hepatitis C: where challenge meets opportunity. **Nature medicine**, v. 19, n. 7, p. 850-858, 2013.

- 3) WHO. World Health Organization. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection. 2014.
Available at: < <http://www.who.int/hiv/pub/hepatitis/hepatitis-c-guidelines/en/> > Accessed in: 12 april 2016.
- 4) CHOO Q-L, et al. Isolation of small cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**; v. 244, p. 359-362, 1989.
- 5) SMITH, D.B. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology**, v. 59, p.318–327, 2014.
- 6) CHAYAMA, K.; HAYES, C.N. Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 26, p. 83-95, 2011.
- 7) WANG, L-J. et al. Treatment-emergent depression and anxiety between peginterferon alpha-2a versus alpha-2b plus ribavirin for chronic hepatitis C. **BioMed Central Psychiatry**. v.16, n. 424, p. 2-8, 2016.
- 8) GOWER, E. et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1, p. S45-S57, 2014.
- 9) MESSINA, J.P. et al. Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 77-87, 2015.
- 10) BUSEK, S.; OLIVEIRA, G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, p. 117-123, 2003
- 11) TAHERKHANI, R.; FARSHADPOUR, F. Epidemiology of hepatitis C virus in Iran. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n.38, p. 10790-10810, 2015.
- 12) BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções**. Brasília, DF, 2011.
- 13) GHANY, M.G. et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. **Hepatology**, v. 49, n. 4, p.1335-1374, 2009
- 14) FERENCI, P., et al. Peginterferon alfa-2a/ribavirin for 48 or 72 weeks in hepatitis C genotypes 1 and 4 patients with slow virological response. **Gastroenterology**, v. 138, n. 2, p 503-512, 2010.
- 15) IVANOV, A. V et al. HCV and Oxidative Stress in the Liver. **Viruses**, v.5, n. 2 p. 439–469, 2013.
- 16) JAESCHKE, H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: present concepts. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.26, n. 1, p.173–179, 2011.
- 17) CHOI, J. Oxidative stress, endogenous antioxidants, alcohol, and hepatitis C: pathogenic interactions and therapeutic considerations. **Free Radical Biology Medicine**, v. 52, p.1135–1350, 2012.

- 18) FUJINAGA, H., et al. Hepatocarcinogenesis in hepatitis C: HCV shrewdly exacerbates oxidative stress by modulating both production and scavenging of reactive oxygen species. **Oncology**, v.81, n. 1, p.11–17, 2011.
- 19) TSUKIYAMA-KOHARA K. Role of oxidative stress in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis C virus. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p.15271–15278, 2012.
- 20) AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.**, v.105, p.121–127, 1984.
- 21) AKERBOOM, T.P.M., SIES, H. Assay of Glutathione Disulfide, and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples. **Methods in Enzymology**, V.77, p. 373-382, 1981.
- 22) JACQUES-SILVA, M. C. et al. Diphenyldiselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacology & Toxicology**, v. 88, n. 3, p. 119-125, 2001.
- 23) LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-487, 1990
- 24) OHKAWA, H.; OHISHI, H. & YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Annals of Biochemistry**. v. 95, p. 351-8, 1979.
- 25) SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation research**, v.31, n. 9, p. 9-15, 1975.
- 26) ALVES, A. V. et al. Hepatite Crônica pelo Vírus C com Interferon- α e Ribavirina: a experiência da Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul. **Arquivos Gastroenterologia**, v.40, n.4, 2003.
- 27) BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais**, Brasília, DF, 2015.
- 28) BANJAC, V.; ZIVLAK-RADULOVIC, N.; MISKOVIC, M. The Effect of Combination Antiviral Therapy in the Treatment of Hepatitis C on the Occurrence of Depressive Disorder in Patients Treated for Hepatitis C in the Republic of Srpska. **Medical Archive**. v. 70, n. 2, p. 127-130, 2016.
- 29) MEDEIROS, L. P. J. et al. Interferon-induced depression in patients with hepatitis C: an epidemiologic study. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 60, n. 1, p. 35-39, 2014.
- 30) CAMPIOTTO, S.; PINHO, J. R. R.; CARRILHO, F. J. *et al.* Geographic distribution of hepatitis C vírus genotypes in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 38, n. 1, p. 41-49, 2005.
- 31) SILVA, S.M. et al. Avaliação do hemograma em pacientes tratados para hepatite C. **Revista Paraense de Medicina**, v. 28, n. 2, p. 9-13, 2014.
- 32) CHUNG, R. T. et al. Association of Host Pharmacodynamic Effects with Virologic Response to Peginterferon Alfa-2a/Ribavirin in Chronic Hepatitis C. **Hepatology**, v. 52, n. 6, p. 1906-1914, 2010.

- 33) FRIED, M. W. et al. Peginterferon alfa-2a Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection. **The New England Journal of Medicine**. v. 347, n.13, p. 975-982, 2002.
- 34) LEVENT, G et al. Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis C patients before and after pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin therapy. **Journal of Translational Medicine**, v.4, n.25, p.1-6, 2006.
- 35) AHMED M.M. Oxidative status and the response to pegylatedinterferon alpha2a plus ribavirin in chronic genotype 4 hcv hepatites. **Excli Journal**, v. 12, p.605-615, 2013.
- 36) CHROBOT A.M.; SZAFLARSKA-SZCZEPANIK, A.; DREWA, G. Antioxidant defense in children with chronic viral hepatitis B and C. **Medical Science Monitor**, v.6, n.4, p.713-718, 2000.
- 37) DIKICI, I. et al. Investigation of oxidative stress and some antioxidants in patients with acute and chronic viral hepatitis B and the effect of interferon- α treatment. **Clinical Biochemistry**. v. 38, n. 12, p. 1141-1145, 2005.
- 38) BOYA, P. et al. Antioxidant status and glutathione metabolism in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v. 31, n. 5, p. 808-814, 1999.
- 39) FARIAS et al. Antioxidant supplementation attenuates oxidative stress in chronic hepatitis C patients. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 35, n. 6, p. 386-394, 2012.
- 40) LARREA, E. et al. Superoxide dismutase in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Free Radical Biology & Medicine**, v.24, n. 7-8, p. 1235-1241, 1998.
- 41) LEITE, S.T.A.P. et al. Increased frequency of micronuclei in the lymphocytes of patients chronically infected with hepatitis B or hepatitis C virus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n.1, p. 15-20, 2014.

PARTE III

4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho indicam que os portadores de HCV possuem:

- Idade superior a 40 anos, na maioria são homens, não institucionalizados e a grande maioria possui o genótipo 1b;
- Alterações hematológicas como contagem de plaquetas e níveis de hemoglobina diminuídos;
- Marcadores de função hepática significativamente aumentados no momento do diagnóstico e ao longo do tratamento combinado, a atividade da TGO e TGP diminuem;
- Atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPX diminuídas e após a terapia antiviral, as atividades são reestabelecidas;
- Compostos antioxidantes como a GSH, vitamina C e TAS em níveis reduzidos e ao longo do tratamento combinado, esses parâmetros são aprimorados;
- O dano oxidativo nas proteínas, lipídeos e DNA estão aumentados e ao longo do tratamento combinado apresentam melhora significativa.

5 PERSPECTIVAS

Este trabalho tem como perspectivas futuras:

- Avaliar marcadores inflamatórios;
- Quantificar níveis de adiponectina sérica;
- Determinar perfil lipídico nos portadores de HCV;
- Verificar parâmetros de estresse oxidativo e da atividade antioxidante nos portadores de HCV que estão utilizando a nova terapia.

REFERÊNCIAS

- ABEL, S. et al. Altered lipid profile, oxidative status and hepatitis B virus interactions in human hepatocellular carcinoma. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 81, n. 5-6, p. 391–9, 2009.
- AGGARWAL, R & NAIK, S. Epidemiology of hepatitis E: current status. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 24, n.9, p.1484-1493, 2009.
- AGUIRRE, J. & LAMBETH, J. D. Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. **Free radical biology & medicine**, v. 49, n. 9, p. 1342–53, 2010.
- AKAIKE, T. et al. Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 6, p. 2448–2453, 1996.
- ALTER, M. J. et al. Risk factors for acute non-A non-B in the United States and association with hepatitis C virus infection. **Journal of the American Medical Association**. v. 264, n. 17, p. 2231-2235, 1990.
- ANSALDI, F. et al. Hepatitis C virus in the new era: Perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 29, p. 9633–9652, 2014.
- APPEL-DA-SILVA, M.C. Incidence of hepatocellular carcinoma in outpatients with cirrhosis in Brazil: A 10-year retrospective cohort study. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 46, p. 10219-10225, 2016.
- AQUINO, J.A. et al. Soroprevalência de infecções por vírus da hepatite B e vírus da hepatite C em indivíduos do Estado do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 334-337, 2008
- ASSELAH, T. et al. Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirina. **Liver International**, v. 30, n. 9, p. 1259-1269, 2010.
- AUGUSTO, F. & LOBATO, C. Hepatite C. In: **Hepatites Víricas**. Ed. Núcleo de Gastreenterologia dos Hospitais Distritais. p. 122-130, 2004.
- BATINIĆ-HABERLE, I.; REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIĆ, I. Superoxide dismutase mimics:

chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Antioxidants & redox signaling**, v. 13, n. 6, p. 877–918, 2010.

BERRA, C. M. & MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v.29, 1340-1344, 2006

BERGMANN, D., OLIVEIRA, S.S.S., OLIVEIRA, T.B. Análise do Serviço de Atenção Farmacêutica aos Pacientes Portadores de Hepatite C no Hospital Santo Ângelo, RS. **Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI**, v.10, n.18, p. 25-36, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hepatites virais: o Brasil está atento**. 3. ed. Brasília, DF, 2008.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **ABCDE do diagnóstico para as hepatites virais**. Brasília, DF, 2009.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Brasília, DF, 2010.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e co-infecções**. Brasília, DF, 2011.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Suplemento 2: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Para Hepatite Viral C e Coinfecções (Genótipo 1 do HCV e Fibrose Avançada)**. Brasília, DF, 2013.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais**, Brasília, DF, 2015.

_____. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico - Hepatites virais**. v. 15, p. 1–72, 2016.

BRASS, V. et al. Conserved determinants for membrane association of nonstructural protein 5A from hepatitis C virus and related viruses. **Journal of Virology**. v.81, n.6, p. 2745-2757, 2007

- CAI, J. et al. Biomarkers of oxidation stress, inflammation, necrosis and apoptosis are associated with hepatitis B-related acute-on-chronic liver failure. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 40, n. 1, p. 41-50, 2015.
- CAMPIOTTO, S. et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 38, n. 1, p. 41-49, 2005.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Hepatitis C information for the public. Atlanta; 2009. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hepatitis/C/index.htm>>. Acesso em: 10 out, 2015
- CHAN, S. W. Hydrogen peroxide induces La cytoplasmic shuttling and increases hepatitis C virus internal ribosome entry site-dependent translation. **Journal of General Virology**. v. 97, n. 9, p. 2301–2315, 2016.
- CHAYAMA, K. & HAYES, C. N. Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 26, p. 83-95, 2011.
- CHOI, J. Oxidative stress, endogenous antioxidants, alcohol, and hepatitis C: pathogenic interactions and therapeutic considerations. **Free Radical Biology Medicine**, v. 52, p.1135–1350, 2012.
- CHOO Q-L, et al. Isolation of small cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**; v. 244, p. 359-362, 1989.
- COOKE, M.S. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. **FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 10, p. 1195–1214, 2003.
- COSTA PASSOS, A. D. Aspectos epidemiológicos das hepatites virais. **Medicina**, v. 36, n. 1, p. 30–36, 2003.
- DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p. 23-38, 2003.
- DAVIS, G. L. et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. **The New England Journal of Medicine**. v. 339, n.21, p. 1493-1499, 1998.

FERENCI, P., et al. Peginterferon alfa-2a/ribavirin for 48 or 72 weeks in hepatitis C genotypes 1 and 4 patients with slow virological response. **Gastroenterology**, v. 138; p 503-512, 2010.

FERREIRA, A. L. A. & MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas e sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.

FINKEL, T. & HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FOCACCIA R. **Hepatites virais**. São Paulo: Editora Atheneu; 1998.

_____. **Hepatites virais**. 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2007.

FRIDOVICH, I. Superoxide and evolution. **Horizons in Biochemistry and Biophysics**. p. 1-37, 1974.

FRIED, M. W. et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n.13, p.975-982, 2002.

FUJINAGA, H., et al. Hepatocarcinogenesis in hepatitis C: HCV shrewdly exacerbates oxidative stress by modulating both production and scavenging of reactive oxygen species. **Oncology**, v.81, p.11-17, 2011.

GAZE, R. et al. Das hepatopatias e icterícias às hepatites virais: configuração de um caleidoscópio. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 1, p. 116-122, 2013.

GERMER, J. Determination of Hepatitis C Virus Genotype by Direct Sequence Analysis of Products Generated with the Amplicor HCV Test. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.8, p. 2625-2630, 1999.

GEISZT, M. & LETO, T. L. The Nox Family of NAD(P)H Oxidases: Host Defense and Beyond. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 51715-51718, 2004.

GHANY, M.G. et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. **Hepatology**, v. 49, n. 4, p.1335-1374, 2009

GILLHAM, B.; PAPACHRISTODOULOU, D. K.; THOMAS, J. H. The Endocrine Tissues. **Biochemical Basis of Medicine**, p. 255-78, 1997.

GOETZ, M. E. & LUCH, A. Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens. **Cancer Letters**, v.266, p.73-83, 2008.

GOODE, H.F.; COWLEY, H.C. & WALER, B.E. Decrease antioxidant status and peroxidation in patient with septic shock and secondary organ dysfunction. **Critical Care Medicine**, v. 23, p. 646-651, 1995.

GOWER, E. et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1, p. S45-S57, 2014.

GOYAL, M. M. & BASAK, A. Human catalase: Looking for complete identity. **Protein and Cell**, v. 1, n. 10, p. 888–897, 2010.

GRETCH, D. R. Diagnostic Tests for Hepatitis C. **Hepatology**, v. 26, n. 3, suppl 1, p. 43s- 47, 1997

GUPTA, E.; BAJPAI, M.; CHOUDHARY, A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. **Asian Journal Transfusion Science**, v. 8, n.1, p.19 –25, 2014.

GUTTERIDGE, J. C. & HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 136-147, 2000.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006.

_____. Free radicals and antioxidants – quo vadis ? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125–130, 2011.

HALLIWELL, B. & CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspective**, v. 102, n. 2, p. 5–12, 1994.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HANAFIAH, K. M. et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatology**, v. 57, n.4, p.1333-1342, 2013.

HASSAN, M. et al. Oxidative Stress Response in Patients Infected by Diverse Hepatitis C. **Virus Genotypes**. v. 15, n. 2, p. 1–5, 2015.

HAWKINS, C. L. & DAVIES, M. J. Generation and propagation of radical reactions on proteins. **Biochimica et biophysica acta**. v. 1504, p. 196-219, 2001.

HEIAT, M.; RANJBAR, R. & ALAVIAN, S. M. Classical and modern approaches used for viral hepatitis diagnosis. **Hepatitis Monthly**, v. 14, n. 4, 2014.

HOSAKOTE, Y. M. et al. Respiratory syncytial virus induces oxidative stress by modulating antioxidant enzymes. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 41, n. 3, p. 348–57, 2009.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, n.5, p. 1170-1179, 2008.

IRSHAD, M.; MANKOTIA, D. S.; IRSHAD, K. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 44, p. 7896–7909, 2013.

IVANOV, A. V et al. HCV and Oxidative Stress in the Liver. **Viruses**, v.5, n. 2 p. 439–469, 2013.

JACOBSON, I. M. The HCV Treatment Revolution Continues : Resistance Considerations , Pangenotypic Efficacy , and Advances in Challenging Populations. **Gastroenterol Hepatol**, v. 12, n. 10, 2017.

JAESCHKE, H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: present concepts. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.26, n. 1, p.173–179, 2011.

KANDEEL, A et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in Egypt 2015: implications for future policy on prevention and treatment. **Liver International**, v.37, n. 1, p. 45-53, 2017.

KERSHENOBICH D et al. Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. **Liver International**: official journal of the International Association of the Study of the Liver, v.31, n.2, p. 18-29, 2011

KHADEM ANSARI, M. H.; OMRANI, M.-D.; KHERADMAND, F. Oxidative Stress Response in Patients Infected by Diverse Hepatitis C Virus Genotypes. **Hepatitis Monthly**, v. 15, n. 2, p. 1–5, 2015.

KLIMCZAK, I. et al. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3–4, p. 313–322, 2007.

KOWALTOWSKI, A. J. & VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 3-4, p. 463–471, 1999.

KUMAR, D. et al. Hepatitis C virus genotype 3 is cytopathic to hepatocytes: Reversal of hepatic steatosis after sustained therapeutic response. **Hepatology**, v. 35, n. 5, p. 1266-1272, 2002.

LANGE, C. M. et al. Emerging therapies for the treatment of hepatitis C. **EMBO Molecular Medicine**, v. 6, n. 1, p. 4-15, 2014.

LEFÈVRE, G. et al. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. **Annales de Biologie Clinique**, v. 56, n. 3, p. 305-319, 1998.

LOZANO-SEPULVEDA, S. A. et al. Oxidative stress modulation in hepatitis C virus infected cells. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 29, p. 2880–2889, 2015.

LYRA, A.C.; FAN, X.; DI BISCEGLIE, A.M. Molecular Biology And Clinical Implication Of Hepatitis C Virus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37p. 691-695, 2004

MEDVEDEV, R.; PLOEN, D.; HILDT, E. HCV and Oxidative Stress: Implications for HCV Life Cycle and HCV-Associated Pathogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

MEHTA, S.H. et al. Limited uptake of hepatitis C treatment among injection drug users. **J. Community Health**, v. 33, 2008.

MEISTER, A. & ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Reviews of Biochemistry**, v.45, p. 711-760, 1983.

MESSINA, J.P. et al. Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 77-87, 2015.

MILIC, M. et al. Polymorphisms in DNA repair genes: link with biomarkers of the CBMN cytome assay in hospital workers chronically exposed to low doses of ionising radiation. **Archives of industrial hygiene and toxicology**, v.66, n.2, p.109-120, 2015

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Saúde. Superintendência de Epidemiologia. Gerência de Vigilância Epidemiológica. **Guia Estadual de Orientações Técnicas das Hepatites Virais**, 2. ed. Belo Horizonte, MG, 2007

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS Tecnologia da Informação à Serviço do SUS. **Hepatites virais - casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Brasil**. 2017. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/hepabr.def>> . Acesso em: 12 abr 2017.

MOHD, H. K, et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatology**, v.57, p.1333–1342, 2013.

MORGAN, R.L. et al. Eradication of hepatitis C virus infection and the development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of observational studies. **Ann Intern Med**. v.158, p.329-337, 2013

MOSLEY, J. W. Viral hepatitis: a group of epidemiologic entities. **Canadian Medical Association Journal**, v. 106, n. 427, p. 427-434, 1972.

MULTIMER, D. et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 60, n. 2, p. 392–420, 2014.

NAINAN, O. V. et al. Hepatitis C Virus Genotypes and Viral Concentrations in Participants of a General Population Survey in the United States. **Gastroenterology**, v.131, n. 2, p. 478-484, 2006.

NAKAMOTO, S. et al. Antiviral therapies for chronic hepatitis C virus infection with cirrhosis. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 8, p. 1133–1141, 2015.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v.49, p.503-15, 2010.

- OLAGNIER, D. et al. Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic programs in dengue virus-infected dendritic cells. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 12, p. e1004566, 2014.
- PAL, S. et al. Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 25, n. 3, p. 627–634, 2010.
- PETERHANS, E. Reactive oxygen species and nitric oxide in viral diseases. **Biological Trace Element Research**, v. 56, p.107-116. 1997.
- PREFEITURA MUNICIPAL DE URUGUAIANA. **História de Uruguaiana**. Site, 2017. Disponível em: <http://www.uruguaiana.rs.gov.br/pmu_novo/historia>. Acesso em: 11 fev. 2017, 16:00:00.
- RÉ, V. et al. Identification of hepatitis C virus subtype 2c by sequencing analysis in patients from Córdoba, Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 8, p. 995–8, 2007.
- RICE, C. M. New insights into HCV replication: potential antiviral targets. **Topics in antiviral medicine**, [S.l.], v. 19, n. 3, p. 117-20, 2011.
- RODRIGUES-LUNA, H. & DOUGLAS, D. D. Natural history of hepatitis C following liver transplantation. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 17, n. 4, p. 363-371, 2004.
- RODRIGUES, N. J. et al. Prevalência da hepatite viral C em adultos usuários de serviço público de saúde do município de São José dos Pinhais – Paraná. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.15 p.627-638, 2012.
- SATO A et al. Clinical characteristics of patients who developed hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus eradication with interferon therapy: current status in Japan. **Internal Medicine**, v. 52, n. 24, p. 2701-2706, 2013.
- SBARIGIA, U. et al. Conceptual framework for outcomes research studies of hepatitis C: An analytical review. **Infection and Drug Resistance**, v. 9, p. 101–117, 2016.
- SCHEUEUR, P. Classification of chronic hepatitis: a need for reassessment. **Journal of Hepatology**, v.13, p. 372-374, 1991
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SIES, H. Physiological society symposium:impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 292-295, 1997.

SMITH, D.B. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology**, v. 59, p.318–327, 2014.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.69, p. 82, 2001.

SUZUKI, T. et al. Molecular biology of hepatitis C virus. **Journal of Gastroenterology**, v. 42, n. 6, p. 411-23, 2007.

TSANG, A. H. K. & CHUNG, K. K. K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1792, p. 643-650, 2009.

TSUKIYAMA-KOHARA K. Role of oxidative stress in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis C virus. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p.15271–15278, 2012.

VALKO, M. et al. Free radicals , metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VANCINI, R. L. et al. Influência do exercício sobre a produção de radicais livres. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, v. 10, n. 2, p. 47–58, 2012.

VEZALI, E.; AGHEMO, A.; COLOMBO, M. Interferon in the treatment of chronic hepatitis C: a drug caught between past and future. **Expert opinion on biological therapy**, v. 11, n. 3, p. 301–313, 2011.

VICTOR, V. M. et al. oxidative stress and mitochondrial dysfunction in atherosclerosis: mitochondria-targeted antioxidants as potential therapy. **Curr Med Chem**, v. 9, p. 376-389, 2009.

WANG, Y. Scotomas in molecular virology and epidemiology of hepatitis C virus. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, p.7910-7921, 2013.

WEBSTER, D. P.; KLENERMAN, P.; DUSHEIKO, G. M. Hepatitis C. **The Lancet**, v. 385, n. 9973, p. 1124-1135, 2015.

WHO. World Health Organization. Global policy report on the prevention and control of viral hepatitis. 2012. Available at: <http://www.who.int/hiv/pub/hepatitis/global_report/en/>. Accessed in: 12 april 2016.

_____. World Health Organization. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection. 2014.

Available at: <<http://www.who.int/hiv/pub/hepatitis/hepatitis-c-guidelines/en/>> Accessed in: 12 april 2016.

_____. World Health Organization. Viral hepatitis – 400 deaths a day in the WHO European Region could be prevented. 2015. Available at: <<http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/hepatitis/news/news/2015/07/viral-hepatitis-400-deaths-a-day-in-the-who-european-region-could-be-prevented>> Accessed in: 20 nov 2016.

ZHANG, Y. et al. Antioxidants: potential antiviral agents for Japanese encephalitis virus infection. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 24, p. 30–36, 2014.

ZHU, Y.; CHEN, S. Antiviral treatment of hepatitis c virus infection and factors affecting efficacy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 47, p. 8963–8973, 2013.

ZOPF, S. et al. Advances in hepatitis C therapy: What is the current state - what come's next? **World Journal of Hepatology**, v. 8, n. 3, p. 139–147, 2016.

ANEXOS

Anexo A - Ficha Farmacoterapêutica
Hepatite Viral Crônica C - Interferon Alfa Peguilado, Ribavirina e IP's Ficha

1. DADOS DO PACIENTE

Nome: _____
 Cartão SUS: _____ CPF: _____ Identidade: _____
 Data de nascimento: _____ Idade: _____
 Sexo: M F Peso: _____ Altura: _____
 Escolaridade: _____ Profissão: _____
 Endereço: _____ Bairro: _____
 Cidade: _____ CEP: _____
 Telefones: _____

Médico responsável: _____ CRM: _____
 CPF: _____ Telefone: _____

Tipo de processo: Administrativo Judicial
 SUS Particular Convênio. Qual? _____

2. AVALIAÇÃO FARMACOTERAPÊUTICA

Data entrevista inicial: ___/___/___ Dia da semana: _____
 Data começo do tratamento: ___/___/___ Apresentação: _____
 Data 12ª semana: ___/___/___ Dose ribavirina: _____
 Inibidor de Protease: _____
 Data de término do tratamento: 24semanas ___/___/___
 48 semanas ___/___/___
 72 semanas ___/___/___

2.1. Quando foi diagnosticada a hepatite C? _____

2.2. Qual a via de contaminação?

Transusão Drogas EV Tatuagem Cirurgia Sexual Não sabe Outro _____

Confiabilidade: Excelente Bom Regular Ruim

Ano de contaminação? _____

2.3. Já fez tratamento para Hepatite C anteriormente? não sim

Tratamento	Posologia	Tempo de tratamento	Resultado	Interrompeu?
			<input type="checkbox"/> Recidivante <input type="checkbox"/> Não respondedor	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Motivo: _____ _____

2.4. Transplantado hepático? não sim

2.5. Paciente é mulher em idade fértil?

não

sim → apresentar exame beta-HCG

2.6. Fez vacina contra Hepatite B? sim não → Orientar

2.7. Possui outras doenças diagnosticadas? não sim → Quais?

Doença	Data de início	Data de fim	Controlada?
			<input type="checkbox"/>
			<input type="checkbox"/>
			<input type="checkbox"/>
			<input type="checkbox"/>

2.8. Faz uso de outros medicamentos? não sim → Quais?

Nome	Dose/dia; Via	Data início	Prescrição?
			<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
			<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
			<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
			<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
			<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
			<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
			<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não

2.9. Já apresentou reações alérgicas a medicamentos? não sim → Quais? A que medicamentos?

Nome	Posologia	Reações apresentadas

2.10. Já fez uso de bebidas alcoólicas?

não (nunca bebeu)

sim → sim, mas parou de beber → Quando parou? _____

sim e bebe atualmente

Tipo de bebida

Quantidade

Frequência

cerveja

vinho

cachaça

whisky

outro: _____

3. MONITORIZAÇÃO DO TRATAMENTO

Registro dos exames laboratoriais:

Última biópsia hepática: Data ___/___/___

Fibrose: F0 F1 F2 F3 F4

Atividade: A0 A1 A2 A3

Genotipagem: 1 1a 1b 2 3 Data ___/___/___

Sem biópsia hepática

Motivo: _____

Exames	Data	Inicial	Exames	Data	Inicial
Bilirrubina			Gama GT		
Ácido úrico			Fosf Alc		
TP			HIV		
Albumina			HbsAg		
Glicemia de jejum					

Exames	Inicial	1º mês				2º mês				3º mês			
		S 1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
Data prevista													
Data													
Hemoglobina													
VCM													
Leucócitos													
Neutrófilos													
Linfócitos													
Plaquetas													
ALT (TGP)													
AST (TGO)													
Creatinina													
TSH													
HCG													

Exames	4º mês	5º mês	6º mês	7º mês	8º mês	9º mês	10º mês	11º mês	12º mês
Data prevista									
Data									
Hemoglobina									
VCM									
Leucócitos									
Neutrófilos									
Linfócitos									
Plaquetas									
ALT (TGP)									
AST (TGO)									
Creatinina									
TSH									
HCG									

Alteração da dose de ribavirina:

Dose total/dia	Data de início	Data de término	Motivo

Alterações de dose dos medicamentos utilizados ou novos medicamentos:

Nome	Dose/ via	Data de início	Data de término

Terapia adjuvante - uso do filgrastima e eritropoetina:

Nome	Dose/ via	Data de início	Data de término

Monitorização da Resposta Viroológica:

	Inicial*	4 sem*	12 sem*	24 sem*	48 sem**	72 sem**
Data						
Resultado						

* Detecção por tecnologia biomolecular de ácido ribonucléico (quantitativa)

** Detecção por tecnologia biomolecular de ácido ribonucléico (qualitativa)

4. FINALIZAÇÃO:

Os sintomas mais difíceis durante o tratamento foram:

Encerramento do tratamento: _____

Período: _____ à _____.

