

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**VITAMINA C PLASMÁTICA ESTÁ NEGATIVAMENTE
ASSOCIADA COM A ATIVIDADE DAS
AMINOTRANSFERASES EM PACIENTES COM
HEPATITE C NÃO TRATADOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rosane Maria Souza dos Santos

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**VITAMINA C PLASMÁTICA ESTÁ NEGATIVAMENTE
ASSOCIADA COM A ATIVIDADE DAS
AMINOTRANSFERASES EM PACIENTES COM HEPATITE C
NÃO TRATADOS**

por

Rosane Maria Souza dos Santos

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof.^a Cristina Wayne Nogueira

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**VITAMINA C PLASMÁTICA ESTÁ NEGATIVAMENTE ASSOCIADA
COM A ATIVIDADE DAS AMINOTRANSFERASES EM PACIENTES
COM HEPATITE C NÃO TRATADOS**

elaborada por
Rosane Maria Souza dos Santos

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Cristina Wayne Nogueira, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Lissandra Dal Lago, Dr^a. (UFSM)

Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 20 de abril de 2007.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho. De maneira particular, expresso minha gratidão:

Principalmente a Deus, por iluminar o meu caminho;

Aos que foram as “peças-chaves” de meu trabalho, os pacientes portadores de Hepatite C, que me ensinaram muito mais do que pude ensinar-lhes;

Agradeço à minha família e a meus amigos, pelo apoio, e principalmente pela compreensão de minha ausência em situações que julgava necessária a minha presença;

À professora Cristina e ao professor João Batista, pela oportunidade, orientação, conselhos e desabafos;

Ao Hospital Universitário de Santa Maria, principalmente aos serviços do Laboratório de Análises Clínicas e ao Ambulatório de Gastroenterologia;

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, por disponibilizar o espaço físico para a realização dos experimentos;

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, pela colaboração;

Aos meus colegas de laboratório, os quais não poderia deixar de citar: Andreza, Iara, Elisângela, Dievan e Sally, pela colaboração em todas as fases deste trabalho (nas mais e menos “turbulentas”); a Cris e a Marina pelo auxílio na disciplina de docência;

Agradeço a todos os funcionários da UFSM, especialmente a Angélica, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

VITAMINA C PLASMÁTICA ESTÁ NEGATIVAMENTE ASSOCIADA COM A ATIVIDADE DAS AMINOTRANSFERASES EM PACIENTES COM HEPATITE C NÃO TRATADOS

AUTOR: Rosane Maria Souza dos Santos

ORIENTADORA: Cristina Wayne Nogueira

CO-ORIENTADORA: Maria Beatriz Moretto

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 20 de abril de 2007.

Neste trabalho, a possível relação entre a atividade das aminotransferases e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com hepatite C foi avaliada. Pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) confirmada por HCV RNA positivo no soro, sem tratamento, foram divididos em três grupos: grupo I (15 a 39 U/L); grupo II (41 a 76 U/L); grupo III (81 a 311 U/L) de atividade da alanina aminotransferase (ALT). Um número de parâmetros foi examinado no sangue como indicadores de estresse oxidativo, incluindo catalase, glutathione peroxidase, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), grupos tióis protéicos (P-SH), grupos tióis não protéicos (NP-SH) e vitamina C. Os resultados demonstraram que os marcadores P-SH, NP-SH, TBARS, atividade da glutathione peroxidase e catalase dosadas no sangue dos indivíduos incluídos nos grupos de estudo não foram diferentes significativamente ($P > 0.05$). O antioxidante vitamina C foi significativamente diminuído no grupo III ($P = 0.001$) e no grupo II ($P = 0.03$) quando comparado com o grupo I. A vitamina C correlacionou-se negativamente com atividade da AST ($r = -0.29$; $P = 0.042$) em todos os grupos. Nossos dados sugerem que a dosagem da vitamina C no plasma pode ser usada como um indicador adicional da severidade da hepatite C, já que foi negativamente associada com a atividade das aminotransferases. A terapia com antioxidantes, assim como vitamina C, pode, então, ter um papel no retardo da progressão da doença hepática.

Palavras-chave: hepatite C; aminotransferases; estresse oxidativo; vitamina C; antioxidantes.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

PLASMATIC VITAMIN C IN NON-TREATED HEPATITIS C PATIENTS IS NEGATIVELY ASSOCIATED WITH AMINOTRANSFERASE ACTIVITIES

AUTHOR: Rosane Maria Souza dos Santos

ADVISOR: Cristina Wayne Nogueira

Date and Place of the Defense: Santa Maria, April 2007

In this study, the possible relationship between aminotransferase activities and markers of oxidative stress in hepatitis C patients was evaluated. Patients with HCV (hepatitis C virus) infection confirmed by positive HCV RNA in serum, without treatment to hepatitis C were divided into three groups: group I (15 to 39 U/L); group II (41 to 76 U/L); group III (81 to 311 U/L) of alanine aminotransferase (ALT) activity. A number of parameters were examined in blood as indicators of oxidative stress, including catalase, glutathione peroxidase, thiobarbituric acid-reactive species (TBARS), non-protein thiol groups (NP-SH), protein thiol groups (P-SH) and vitamin C. The results demonstrated that markers of oxidative stress NP-SH, P-SH, TBARS, glutathione peroxidase and catalase activities measured in blood of these study groups were not significantly different ($P > 0.05$). The antioxidant vitamin C was significantly decreased in Group III ($P = 0.001$) and Group II ($P = 0.03$) when compared with Group I. The vitamin C level correlated negatively with AST activity ($r = -0.29$, $P = 0.042$) for all patients. Our data suggested that vitamin C in plasma determination could be an additional indicator of hepatitis C severity, since plasma vitamin C was negatively associated with aminotransferase activities. Antioxidant therapy, such as vitamin C, may therefore have a role in retarded disease progression in liver.

Key words: hepatitis C; aminotransferases; oxidative stress; vitamin C; antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

FIGURA 1: Estrutura do genoma do HCV.....	15
FIGURA 2: Sistema de transferência de elétrons na mitocôndria.....	24

Artigo

FIGURA 1: ALT (A) and AST (B) activity in plasma of patients in different study groups.....	43
FIGURA 2: Vitamin C levels in plasma of individuals of groups I, II and III.....	44
FIGURA 3: (A) Significant negative correlation between vitamin C concentrations and AST activity in plasma and (B) Significant positive correlation between AST activity and ALT activity in plasma.....	45

LISTA DE TABELAS

Artigo

TABELA 1 – Characteristics of study groups.....	41
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – alanina aminotransferase
ANTI-HCV – anticorpos contra o vírus da hepatite C
AST – aspartato aminotransferase
ANOVA – análise de variância
DNA – ácido desoxirribonucléico
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay
EROS – espécies reativas de oxigênio
GPx – glutathione peroxidase
GSH – glutathione reduzida
HBV – vírus da hepatite B
HCV – vírus da hepatite C
HIV – vírus da imunodeficiência humana
MDA - malondialdeído
NADPH - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NK – natural killer
NP-SH – tióis não-protéicos
NS – não estrutural
PCR – reação em cadeia da polimerase
P-SH – tióis-protéicos
RIBA – recombinant immunoblot assay
RNA – ácido ribonucléico
S.E.M – erro médio padrão
TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
APRESENTAÇÃO	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 – Hepatite C	14
2.1.1 – Aspectos gerais	14
2.1.2 – O agente viral e sua transmissão	14
2.1.3 – Patogênese	16
2.1.4 – Diagnóstico	17
2.1.5 – Tratamento	19
2.2 – Estresse oxidativo	20
2.2.1 – Espécies reativas de oxigênio	20
2.2.2 – Antioxidantes	21
2.3 – Estresse oxidativo e hepatite C	22
2.3.1 – Produção de EROS associada à infecção viral	23
2.3.2 – Estresse oxidativo causado pelas proteínas virais	24
2.3.3 – Ferro e EROS	25
2.3.4 – Marcadores de estresse oxidativo na hepatite C	26
3. OBJETIVOS	27
4. ARTIGO CIENTÍFICO	28
4.1 – Plasmatic Vitamin C in Non-treated Hepatitis C Patients is Negatively Associated with Aspartate Aminotransferase (AST)	28
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	48
7. PERSPECTIVAS	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, DISCUSSÃO e CONCLUSÕES** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é um problema de saúde pública em todo mundo, inclusive no Brasil (Brandão et al., 2001). Mundialmente, afeta cerca de 3% da população, sendo relevante o número de pessoas que desconhece o fato de albergar o vírus (Strauss, 2001). Em números absolutos, estima-se que 170 milhões de pessoas estão cronicamente infectados com o HCV em todo mundo; abrangendo em torno de 1% da Europa Ocidental e América do Norte, e cerca de 10 – 20% da população dos países da Ásia e África (Szabo et al., 2004). Dados da Organização Mundial de Saúde estimam que em torno de 3% da população brasileira estaria infectada pelo HCV (Brandão et al., 2001).

O diagnóstico da hepatite C é baseado em testes sorológicos e de biologia molecular. O método sorológico, o qual utiliza pesquisa de anticorpos contra o HCV, é o mais freqüentemente empregado para identificar a infecção, presente ou passada, mas não discrimina a aguda da crônica nem mesmo da infecção curada (Pawlotsky, 1999). As técnicas de biologia molecular, que pesquisam a presença do RNA viral, são consideradas confirmatórias em relação às sorológicas, definindo a atividade da infecção (National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel, 1997). A determinação da atividade da alanina aminotransferase (ALT), um marcador clássico de lesão hepática é considerado como um teste auxiliar no diagnóstico e na avaliação da progressão da doença (Harrison, 1994).

As altas percentagens de cronicidade da doença (cerca de 85% dos pacientes), o potencial evolutivo para a cirrose e para o hepatocarcinoma, e o fato de ser a mais freqüente etiologia diagnosticada em casos de transplante hepático ratificam a importância de ser estabelecido um tratamento cada vez mais eficaz para a hepatite C, o que ainda não está totalmente definido. Atualmente, o tratamento da hepatite C objetiva deter a progressão da doença hepática pela inibição da replicação viral. Os medicamentos disponíveis até o momento são eficazes somente em 40% dos pacientes tratados, salientando-se a importância do diagnóstico precoce, possibilitando melhores resultados tanto da terapia quanto do prognóstico do paciente. Além da baixa eficácia terapêutica, os medicamentos usados, interferon e ribavirina, devem ser administrados por período de tempo prolongado e provocam

efeitos colaterais importantes, exigindo monitoração médica especializada e constante (Strauss, 2001).

O estresse oxidativo, caracterizado como um desequilíbrio entre pró-oxidantes (principalmente EROS-espécies reativas de oxigênio) e antioxidantes, em favor dos pró-oxidantes é comumente associado a desordens inflamatórias (Harrison et al., 2003; Cooke et al., 2003), incluindo doenças hepáticas agudas e crônicas (Lieber, 1997; Parola et al., 2001). Na infecção pelo vírus C, o estresse oxidativo pode comprometer a eficácia da resposta imune do hospedeiro contra o HCV (de Haan et al., 1997), aumentando a suscetibilidade à morte celular (Buttke e Sandstrom, 1994), facilitando, dessa forma, a cronicidade da doença.

Atualmente, é notado um aumento no interesse dos pesquisadores em relação ao uso de antioxidantes na terapia de diversas patologias, incluindo a hepatite C crônica. Como decorrência disso, vários estudos têm sido feitos com administração de antioxidantes em pacientes com infecção crônica pelo vírus C, alguns mostrando uma boa eficácia (Beloqui et al., 1993; Houghlum et al., 1997), outros, porém, discordando desse benefício (Ideo et al., 1999).

Considerando os aspectos acima mencionados, o presente estudo visa estudar a possível relação entre os níveis das aminotransferases e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com hepatite C crônica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hepatite C

2.1.1 Aspectos gerais

A hepatite C vem sendo estudada há vários anos, mesmo antes da descoberta do vírus causador da doença, em 1989. Nos últimos anos, entretanto, houve avanços significativos no entendimento de sua epidemiologia, modos de transmissão, patogênese, diagnóstico e terapêutica (Strauss, 2001). A infecção pelo HCV é a maior causa mundial de doença hepática crônica. Estima-se que mais de 170 milhões de pessoas estejam infectados com o HCV em todo o mundo, e que aproximadamente 70% desses pacientes desenvolverão infecção persistente, sendo que em torno de 30% evoluirão para cirrose. Uma vez instalada a cirrose hepática, a taxa anual do aparecimento de carcinoma hepatocelular é de 5 a 7% (Ikeda, 1998). Atualmente, é a principal indicação de transplante de fígado nos Estados Unidos e na Europa (Gotto e Dusheiko, 2004).

A combinação terapêutica de interferon e ribavirina constitui o único tratamento disponível para a infecção pelo HCV, apresentando a taxa de aproximadamente 10 a 40% de resposta virológica sustentada (Poynard, 1998; McHutchison, 2001). Além disso, não existe vacina eficaz para o vírus; assim sendo, novas perspectivas na melhoria do tratamento da hepatite C fazem-se necessárias (Hoofnagle, 1999).

2.1.2 O Agente viral e sua transmissão

O HCV é um vírus RNA da família flaviviridae, inicialmente reconhecido como vírus da hepatite não-A, não-B em 1974, até que em 1989 foi classificado como agente etiológico da hepatite C (Choo et al., 1989; Alter, 1999).

O genoma do HCV compreende os genes de quatro proteínas estruturais e seis não estruturais (Figura 1). A análise filogenética das seqüências genômicas permitiu a caracterização de 6 genótipos (1 a 6) que são subdivididos em grupos a, b, c, etc. Dentro de um mesmo genótipo e subtipo existem variações do HCV, que são denominadas quasispecies. Isso é possível devido à replicação imperfeita do vírus, com o surgimento de pequenas e constantes mutações (Rosen e Gretch, 1999).

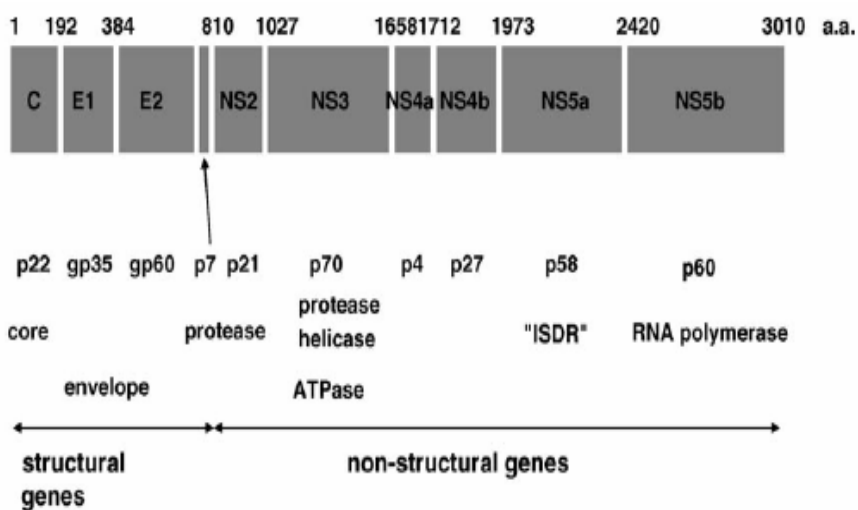


Figura 1 - Estrutura do genoma do HCV

O genoma do HCV consiste de duas partes, uma região estrutural e outra não-estrutural. A primeira compreende as regiões do envelope e do core; a segunda envolve as regiões necessárias para a replicação viral.

O principal modo de transmissão do HCV (60 a 80%) é a exposição a sangue humano infectado, através do uso intravenoso de drogas ilícitas ou transfusões de sangue. A prática da triagem de doadores de sangue para o HCV a partir de 1990 diminuiu consideravelmente o risco de adquirir a infecção através de transfusão. Outras formas parenterais de contaminação são os procedimentos médicos, odontológicos, de acupunturista ou de tatuagem. Portanto, qualquer material

cortante ou perfurante pode ser veículo transmissor do vírus de uma para outra pessoa. Dentre as formas não-parenterais de transmissão da hepatite C, pouco significativas, torna-se importante ressaltar a possibilidade da transmissão sexual (6 a 10%) e a transmissão materno-fetal (menor que 6%), podendo ocorrer particularmente no momento do parto (Strauss, 2001).

2.1.3 Patogênese

Os mecanismos responsáveis pela persistência da infecção pelo HCV não foram ainda totalmente elucidados. A existência de quasiespecies e a grande capacidade mutagênica do vírus propiciam o constante escape à intensa resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro (Strauss, 2001).

Nos últimos anos, as pesquisas têm evidenciado que as lesões hepáticas se relacionam a mecanismos imunomediados. A qualidade da resposta imunológica célula-mediada parece ser crucial para a eliminação ou persistência do HCV (Ferrari et al., 1999). Com referência a este ponto, diversas citocinas imunorregulatórias estão envolvidas na modulação da complexa interação vírus-hospedeiro (Koziel, 1999). As citocinas são produzidas por vários tipos celulares, assim como células NK, macrófagos, células CD4+ e células CD8+. Os linfócitos T CD4+ apresentam respostas distintas Th1 e Th2. Enquanto as células Th1 secretam interleucina 2 e interferon gama estimulando a resposta anti-viral do hospedeiro, as células Th2 produzem interleucinas 4 e 10, que estimulam a formação de anticorpos e inibem a resposta Th1 (Napoli et al., 1996). O desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 seria responsável tanto pela incapacidade de eliminação do HCV como pela maior ou menor gravidade da lesão hepática (Tsai et al., 1997). Em relação aos linfócitos T CD8+, parecem também exercer um papel importante na eliminação do vírus, uma vez que a intensidade da resposta mediada por estas células na fase aguda da infecção é maior nos indivíduos que evoluem para cura, quando comparados àqueles que progridem para a doença crônica (Thimme et al., 2001).

Somado aos fatores mencionados acima, colabora para a persistência do HCV, a ineficiência da atividade apoptótica do hospedeiro, uma vez que esse mecanismo é considerado chave na eliminação da célula infectada pelo vírus

(Barke, 1995; Vaux e Strasser, 1996; Nagata, 1997). Ray et al. (1997) sugerem o envolvimento da proteína do core do HCV com a inibição da apoptose, favorecendo, assim, a persistência viral; entretanto, os achados de Dumoulin et al. (1999) não estão de acordo com esses resultados, havendo, ainda, uma controvérsia em relação à influência das proteínas do vírus na sobrevivência celular.

O principal fator da progressão da doença, a fibrose hepática, ocorre em mais de 60% dos indivíduos infectados pelo HCV (Davis et al., 1994). A ocorrência de fibrose resulta da ativação, diferenciação e proliferação das células *hepatic stellate* por citocinas e outras moléculas sinalizadoras induzidas pelo processo inflamatório, culminando com a produção e depósito de proteínas (Nakomoto et al., 1998).

Além dos mecanismos imuno-mediados, dados da literatura apontam para outras formas importantes do desencadeamento da injúria hepática na infecção pelo HCV. A presença freqüente de esteatose na hepatite C, quando comparada a outras formas de hepatite, sugere uma alteração no metabolismo dos lipídeos (Goodman e Ishak, 1995; Fujie et al., 1999). Ratificando essa afirmação, estudos em ratos transgênicos vêm sugerindo uma relação entre as proteínas do HCV e a indução da esteatose no fígado (Bach, 1992; Moriya, 1997).

Além dos fatores virais mencionados, a progressão da lesão hepática, da hepatite crônica para cirrose, pode relacionar-se a características do hospedeiro, assim como, idade superior a 40 anos no momento do contágio, sexo masculino, consumo de álcool e coinfeção com HBV ou HIV (Koike et al., 2002).

2.1.4 Diagnóstico

2.1.4.1 Diagnóstico sorológico

O teste sorológico para diagnóstico da hepatite C, rotineiramente utilizado desde o início dos anos 90, é um teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite C (anti-HCV) (Strauss, 2001). A detecção do anti-HCV pode indicar infecção presente ou passada, mas não pode diferenciar a crônica da curada (Pawlotsky, 1999). Além disso, em populações de baixo risco é

relatado o aparecimento de falsos resultados positivos nos testes ELISA; nesses casos é requisitado o uso do teste confirmatório, como o Imunoblot – recombinant immunoblot assay (RIBA) (Pawlotsky et al., 1998).

Para definir infecção ativa faz-se necessário a detecção do RNA viral no plasma do paciente, através de técnicas de biologia molecular, podendo ser detectado a partir de 1 a 3 semanas da exposição (National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel, 1997). Para confirmação diagnóstica de hepatite C aconselha-se a determinação qualitativa do RNA-HCV, de preferência pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR). As determinações quantitativas (carga viral), por outro lado, mostram-se muito interessantes antes do início do tratamento, juntamente com a determinação do genótipo, para definir a duração do tratamento. Elas também são utilizadas para monitorizar a resposta terapêutica ou para acompanhamento de casos não tratados (Strauss, 2001).

2.1.4.2 Diagnóstico histológico

Atualmente, a biópsia é considerada o melhor procedimento para revelar a presença de cirrose, a intensidade do processo inflamatório e o estágio de fibrose no tecido hepático. Dessa forma, o diagnóstico histológico revela-se um requisito importante na decisão terapêutica a ser adotada (Desmet et al., 1994; Dienstag 2002). Em contrapartida, vários autores têm questionado a necessidade da realização da biópsia, principalmente em pacientes com atividade normal de ALT, visto que a maioria desses casos apresenta taxas mínimas ou nulas de atividade inflamatória e fibrose (Pradat et al., 2002; Alberti et al., 2002; Okanoue et al., 2005). Além disso, trata-se de um procedimento de alto custo e invasivo, requerendo profissionais especializados, associado ao risco de raras, mas sérias complicações (Piccinino et al., 1986; McGill et al., 1990; Cadranel et al., 2000; Regev et al., 2002). Outros fatores limitantes são os erros de amostragem e a variação inter e intra-observador (Consenso sobre condutas nas hepatites virais B e C, 2005).

2.1.4.3 Dosagem complementar

- Atividade da alanina aminotransferase

A determinação da atividade da ALT é o teste mais utilizado para identificar pacientes com doenças hepáticas (Marshall, 2002). Existe uma controvérsia, entretanto, no seu emprego como marcador da atividade da doença no fígado, uma vez que não existe uma perfeita correlação entre níveis de ALT com os dados histológicos em pacientes com hepatite C (Healey et al., 1995; Haber et al., 1995).

A maioria dos pacientes com hepatite C crônica, em torno de 75%, apresenta níveis elevados de ALT no soro e aproximadamente 20 a 30% mostram níveis persistentemente normais (Tassopoulos, 1999). Alanina aminotransferase persistentemente normal é definida como uma série de dosagens normais (pelo menos três) em um período de seis meses (Pradat et al., 2002). Parece haver uma aparente discrepância entre os dados clínicos e laboratoriais nesse grupo de pacientes, uma vez que alguns deles poderão apresentar avanços na fibrose e cirrose hepáticas (Bacon, 2002); outros, porém, apresentam dados histológicos com leve ou nenhuma atividade inflamatória e fibrose (Mathurin et al., 1998; Jamal et al., 1999). Dessa forma, é importante também salientar que, na maioria dos casos, a lesão é mínima e a progressão para cirrose é menor quando comparada aos pacientes com níveis elevados de ALT (Persico et al., 2000).

Considerando os aspectos acima mencionados, a determinação dos níveis de ALT durante o curso da infecção pelo HCV, sem dúvida, continua sendo um importante guia, principalmente no direcionamento das condutas a serem adotadas (Alberti, 2005).

2.1.5 Tratamento

A terapia para a infecção pelo HCV é considerada difícil, pois após a persistência do vírus no organismo, ele adquire resistência aos efeitos produzidos

pelas citocinas produzidas pelas células T, tornando-se capaz de escapar da resposta imunológica do hospedeiro (Ferrari et al., 1999).

O tratamento de pacientes com hepatite C crônica avançou consideravelmente a partir de 1990. Atualmente, após a associação do interferon com ribavirina, é evidenciado não somente efeito anti-viral, mas também efeitos regulatórios no sistema imune do hospedeiro (Davis et al., 1998). Recentemente, uma nova forma de interferon foi desenvolvida, o interferon peguilado, que consiste em unir uma molécula de polietilenoglicol à molécula de interferon, tornando-o maior, dificultando sua metabolização e, assim, aumentando sua meia-vida (Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Hepatite Viral Crônica C-Interferon-alfa, Interferon-alfa Peguilado, Ribavirina, 2002).

Os indicadores para terapia incluem detecção do RNA viral, aumento da atividade da ALT, evidência histológica de fibrose hepática e moderada inflamação (National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel, 1997). Torna-se importante também ressaltar, a possibilidade do desencadeamento de importantes efeitos colaterais durante o tratamento, dentre eles destaca-se neutropenia, anemia e depressão (Gotto e Dusheiko, 2004).

2.2 Estresse oxidativo

2.2.1 Espécies reativas de oxigênio

Radicais livres derivados do oxigênio, mais conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROS), representam a principal classe de radicais gerados nos sistemas vivos, tendo como característica a capacidade em desempenhar tanto efeitos benéficos quanto maléficos nesses organismos (Valko et al., 2004). Efeitos benéficos ocorrem em baixas ou moderadas concentrações de EROS envolvidas no papel fisiológico da resposta celular, por exemplo, na defesa contra agentes infecciosos. Por outro lado, EROS em altas concentrações podem mediar o dano causado em estruturas celulares, assim como lipídeos, membranas, proteínas e ácidos nucléicos (Poli et al., 2004), resultando em estresse oxidativo.

As fontes de produção de EROS podem ser endógenas ou exógenas. As principais fontes endógenas incluem a mitocôndria, citocromo P450, microsomas, peroxissomas e as células inflamatórias ativadas (Inoue et al., 2003). Fontes exógenas podem gerar diretamente ou induzir indiretamente a formação de EROS nas células; o dano pode ser observado através da exposição a vários xenobióticos, assim como metais, radiação e barbituratos (Klaunig et al., 1997).

As principais EROS incluem o radical superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil (Koike e Miyoshi, 2006). O radical superóxido é considerado a “ERO-primária”, porque pode interagir com outras moléculas e formar “ERO-secundárias”, através de reações catalizadas por metais ou enzimas (Fridovich, 1986). Esse radical não interage diretamente com polipeptídeos, açúcares ou ácidos nucléicos e sua capacidade em peroxidar lipídeos ainda é controversa (Desideri et al., 2003). O peróxido de hidrogênio não contém elétron desemparelhado, e por isso não é considerado um radical livre, mesmo assim, é altamente deletério, pois participa da reação que produz o radical hidroxil. É uma molécula de vida longa, capaz de atravessar camadas lipídicas, podendo reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas, sendo assim, bastante tóxico para as células. A ERO considerada mais reativa em sistemas biológicos é o radical hidroxil, podendo modificar as bases do DNA, inativar proteínas, bem como participar da oxidação dos ácidos graxos das membranas celulares (Ferreira e Matsubara, 1997).

2.2.2 Antioxidantes

A exposição a radicais livres, provenientes de diversas fontes, conduz os organismos a desenvolver uma série de mecanismos de defesa (Cadenas, 1997), tais como: mecanismos de prevenção, de reparo, físicos e as defesas antioxidantes (Valko et al., 2007). Em condições normais, há um equilíbrio entre as reações que envolvem os oxidantes (EROS) e os antioxidantes, sendo mantidas as condições de vida; entretanto na ocorrência de um excesso de EROS e/ou uma deficiência de antioxidantes é estabelecido o processo de estresse oxidativo, podendo culminar com os efeitos nocivos dos radicais livres (Dröge, 2002).

As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas ou não-enzimáticas; as primeiras incluem a superóxido dismutase, a glutatona peroxidase e a catalase, enquanto que as segundas são representadas por vitamina C, vitamina E, glutatona, carotenóides e flavonóides (Valko et al., 2007).

Entre os antioxidantes não-enzimáticos, destaca-se a glutatona, pelos vários papéis que desempenha na proteção contra o estresse oxidativo: funciona como cofator de diversas enzimas detoxificadoras, como exemplo a glutatona peroxidase; participa do transporte de aminoácidos através da membrana plasmática; age diretamente sobre o radical hidroxil e o oxigênio singlet, detoxificando o peróxido de hidrogênio; tem a habilidade em regenerar importantes antioxidantes, como vitamina C e E (Pastore et al., 2003). A vitamina C, considerada a primeira defesa antioxidante no plasma (Yamamoto et al., 1998), tem a capacidade de proteger as membranas celulares contra oxidação (Retsky et al., 1999); adicionalmente, tem sido relatada sua habilidade em regular fatores que influenciam algumas funções celulares, conferindo-lhe um papel na modulação do sistema imune (You et al., 2000). Em relação à vitamina E, devido sua característica lipossolúvel, é o principal antioxidante que age contra o processo de lipoperoxidação (Pryor, 2000).

Com referência aos antioxidantes enzimáticos, a superóxido dismutase (EC1.15.1.1) desempenha importante papel, já que catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. A enzima catalase (EC1.11.1.6) participa da conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular com alta taxa de *turnover* (uma molécula de catalase pode converter aproximadamente 6 milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio por minuto). A glutatona peroxidase age em conjunto com a glutatona, desempenhando um dos mais importantes mecanismos de defesa antioxidante; catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis às custas da oxidação da glutatona (Valko et al., 2006).

2.3 Estresse oxidativo e hepatite C

O envolvimento do estresse oxidativo na patogenia da hepatite C e carcinoma hepatocelular tem sido amplamente sugerido. 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 imuno-reação e ação direta das proteínas virais. Desta forma, esses efeitos agiriam de forma sinérgica, podendo ser responsáveis pelas peculiares características da hepatite C quando comparadas a outras formas de hepatite (Koike e Miyoshi, 2006).

2.3.1 Produção de EROS associada à infecção viral

As infecções crônicas são associadas com produção de EROS no fígado e nas células mononucleares do sangue periférico (Larrea et al., 1998; Boya et al., 1999;). Essas células são essenciais na resposta imune do hospedeiro, tanto na apresentação do antígeno quanto na resposta inflamatória, logo, a sua atuação pode influenciar a progressão da infecção pelo HCV. Assim, monócitos, neutrófilos e células de Kupffer são ativados, liberando EROS (principalmente o ânion superóxido) com a finalidade de combater o microorganismo invasor, controlando a sobrevivência celular (Bonizzi et al., 1999). A produção de EROS pelos fagócitos requer a ativação da NADPH oxidase, que cataliza a redução do oxigênio molecular em ânion superóxido, oxidando o NADPH (Babior, 1999). Dessa forma, os monócitos podem estar envolvidos tanto na resposta imune efetiva, mas também no estabelecimento de estresse oxidativo no fígado, contribuindo na patogênese da infecção viral (Bouffard et al., 1992).

Na hepatite viral, EROS são também produzidas nos hepatócitos através da liberação de citocinas pelas células inflamatórias, assim como fator de necrose tumoral alfa e interleucina 1 (Koike e Miyoshi, 2006). Particularmente, na hepatite C, foi evidenciado que as próprias proteínas do HCV induzem produção de EROS através da NADPH oxidase em neutrófilos (Bureau et al., 2001).

Como mencionado na patogênese da infecção pelo vírus C, as células *hepatic stellate* desempenham um papel chave no desencadeamento da fibrose hepática. Torna-se importante mencionar que EROS produzidas no fígado, como resultado do processo inflamatório são capazes de estimular essas células e a conseqüente síntese de colágeno, culminando com o agravamento do processo fibrogênico (Marra et al., 2000).

2.3.2 Estresse oxidativo causado pelas proteínas virais

Estudos experimentais, usando cultura de células e ratos transgênicos, revelaram o envolvimento de pelo menos duas das proteínas do HCV na indução do estresse oxidativo e no acúmulo de lipídeos no fígado (Moriya et al., 2001; Okuda et al., 2002). Dentre as proteínas, destaca-se a do core do HCV, que se localiza no retículo endoplasmático (Santolini et al., 1994; Moradpour et al., 1996), lipídeos (Barba et al., 1997; Sabile et al., 1999), núcleo (Yasui et al., 1998) e na mitocôndria, podendo, assim, desempenhar efeitos múltiplos na célula. Korenaga e colaboradores (2005) mostraram que a expressão dessa proteína causa um aumento da produção de EROS mitocondrial, inibição da cadeia de transporte de elétrons e um aumento da produção de EROS pelo complexo I da cadeia respiratória (Figura 2), sugerindo uma interação direta da proteína do core com a mitocôndria, sendo uma importante causa do estresse oxidativo visto na hepatite C.

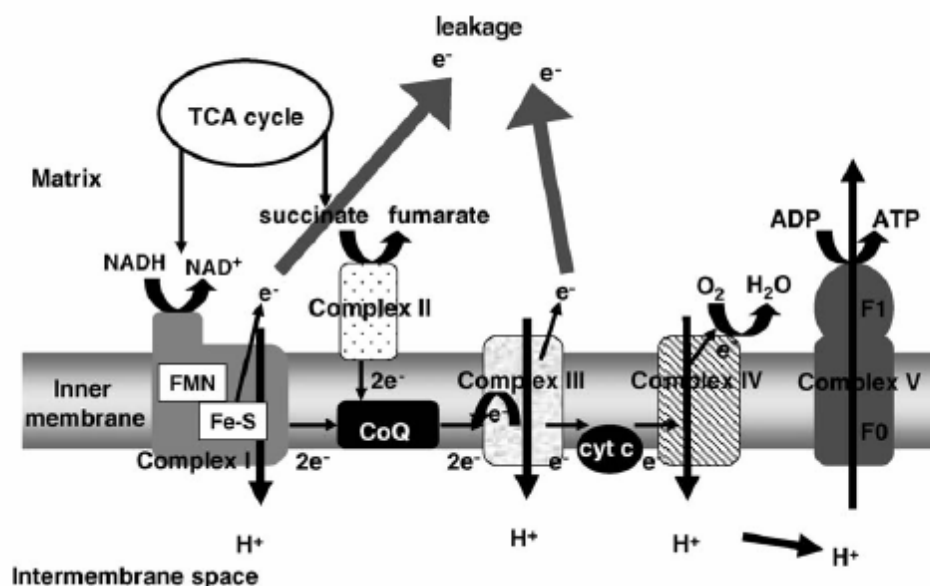


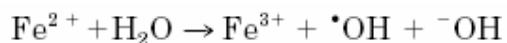
Figura 2 - Sistema de transferência de elétrons na mitocôndria
A maioria do oxigênio consumido pelas células dos mamíferos é convertida em água, via cadeia respiratória. Entretanto, cerca de 5% dos elétrons que entram na cadeia podem “escapar” e formar ânion superóxido, podendo causar uma produção exagerada de EROS.

Ainda em relação à proteína do core, acredita-se que exista seu envolvimento no mecanismo da hepatocarcinogênese nos pacientes com infecção crônica pelo HCV; Moriya e colaboradores (2001) em um modelo com ratos transgênicos verificaram um aumento na produção de EROS, na ausência de inflamação, sugerindo que a proteína do core do HCV *per se* causa estresse oxidativo, culminando em hepatócitos suscetíveis ao dano do DNA e a conseqüente transformação maligna.

Em relação às proteínas não estruturais, Bureau (2001) estimulou monócitos humanos com as proteínas do HCV, verificando que NS3 modula a produção de EROS, através da ativação da NADPH oxidase.

2.3.3 Ferro e EROS

A concentração de ferro presente no fígado é alta, e metais de transição facilitam a transferência de elétrons, desempenhando um importante papel na produção de radicais livres. O ferro ligado a proteínas, assim como ferritina e transferrina é estável, tornando-se instável na forma livre (Radisky e Kaplan, 1998); EROS promovem a liberação do ferro da ferritina (Kakhlon e Cabantchik, 2002), deixando-o livre para catalizar reações com substratos relativamente pouco reativos em produtos com uma alta reatividade, como na reação de Fenton (Halliwell e Gutteridge, 1984):



Tem sido evidenciado um aumento na concentração de ferro no fígado de pacientes com hepatite C crônica (Di Bisceglie et al., 1992; Riggio et al., 1997), sendo correlacionado com o desenvolvimento de fibrose (Beinker et al., 1996), com o grau de inflamação e conseqüente dano no tecido hepático (Bonkovsky et al., 1997). Entretanto, os mecanismos que envolvem esse processo ainda não foram

totalmente elucidados, mas acredita-se que o ferro agiria de forma sinérgica com o vírus no desencadeamento da fibrose, pois associa-se a sobrecarga desse metal com a severidade da infecção pelo vírus C (Bonkovsky et al., 2002).

2.3.4 Marcadores de estresse oxidativo na hepatite

A evidência de estresse oxidativo nos mecanismos patogênicos da infecção pelo HCV tem sido sugerida através do resultado da análise dos marcadores de estresse oxidativo, tais como: (i) níveis aumentados dos produtos de lipoperoxidação (assim como malonaldeído - MDA) no soro (DeMaria et al., 1996; Romero et al., 1998) e fígado (Farinati et al., 1995) dos pacientes quando comparados aos controles, e uma correlação significativa entre os níveis de MDA e a severidade da doença (Paradis et al., 1997; Romero et al., 1998; Yadav et al., 2002); (ii) níveis hepáticos elevados da proteína carbonil (produto do dano oxidativo das proteínas) (De Maria et al., 1996) e 8-OH-deoxiguanosina (revela o dano oxidativo do DNA) nos indivíduos infectados (Shimoda et al., 1994); (iii) redução nos níveis sistêmicos e hepáticos de GSH (Lim et al., 1995; Bernhard et al., 1998), correlacionando-se com a atividade da ALT, carga viral e grau de inflamação hepática (Beloqui et al., 1993; Suarez et al., 1993); (iv) aumento da atividade da superóxido dismutase e do *turnover* da GSH (Boya et al., 1999) nos pacientes em relação aos controles; (v) diminuição nos níveis séricos dos antioxidantes (retinol, β criptoxantina, licopeno, α e β tocoferol, α e β caroteno) nos pacientes HCV comparados aos controles (Yadav et al., 2002); (vi) redução dos níveis de vitamina E em pacientes não respondedores à terapia com interferon (Houglum et al., 1997).

3. OBJETIVOS

O tratamento da hepatite C ainda não está totalmente definido, visto o baixo índice de resposta virológica sustentada observada nos pacientes. Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de vincular formas alternativas à terapia tradicional com interferon e ribavirina, inclusive com o uso de antioxidantes. Da mesma forma, pesquisadores têm demonstrado bastante atenção ao modo que esses antioxidantes poderiam influenciar no curso da infecção pelo vírus C. Dessa forma, este trabalho visa abordar dois aspectos principais: (i) avaliar a possível relação entre a atividade das aminotransferases e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com hepatite C; (ii) determinar se as alterações nos marcadores de estresse oxidativo poderiam ser indicadores dos fatores iniciais da infecção.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo. O artigo está disposto da mesma forma que foi submetido para publicação na Revista *Liver International*.

4.1- Plasmatic Vitamin C in Non-treated Hepatitis C Patients is Negatively Associated with Aspartate Aminotransferase (AST)

Rosane M. Souza dos Santos, Andreza F. de Bem, Elisângela Colpo, Iara Bertoncello, Cristina W. Nogueira, João B. T. Rocha

Artigo submetido para publicação na Revista *Liver International*

Title of the work:

Plasmatic Vitamin C in Non-treated Hepatitis C Patients is Negatively
Associated with Aspartate Aminotransferase (AST)

Authors: **Rosane M. Souza dos Santos, Andreza F. de Bem, Elisângela Colpo,
Iara Bertoncello, Cristina W. Nogueira, João B. T. Rocha***

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade
Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

*Corresponding author:

Dr. João B. T. Rocha
Departamento de Química
Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria RS Brasil - 97105-900

Phone: + 55 55 32209462

Fax: + 55 55 32208978

E-mail: jbtrocha@yahoo.com.br

Abstract

Objectives: to evaluate the possible relationship between aminotransferases levels and markers of oxidative stress in chronic hepatitis C patients.

Design and methods: Patients without treatment for hepatitis were divided in group I (15 to 39 U/L); group II (41 to 76 U/L); group III (81 to 311 U/L) of activity alanine aminotransferase (ALT). Blood markers of oxidative stress (catalase, glutathione peroxidase, thiobarbituric acid-reactive species-TBARS, non-protein and protein thiol groups and vitamin C) were determined.

Results: Protein- and non protein-SH levels, TBARS, glutathione peroxidase and catalase were not different between groups. Vitamin C was significantly decreased in groups II ($P=0.03$) and III ($P=0.001$), when compared to group I and correlated negatively with aspartate aminotransferase (AST; $r=-0.29$, $P=0.042$).

Conclusion: Vitamin C levels were negatively associated with AST, suggesting that vitamin C could be an additional indicator of hepatitis C severity. Therefore, whether dietary supplementation with vitamin C could retard disease progression will need additional studies.

Key Words: Hepatitis C; Aminotransferases; Oxidative stress; Vitamin C; Antioxidants.

Introduction

There are approximately 200 million people infected with hepatitis C virus (HCV) worldwide and it is one of the most serious causes of liver disease. It was reported that approximately 70% of those with HCV infection suffer from persistent infection, causing active or inactive chronic hepatitis and that about 30% of patients with chronic hepatitis are assumed to develop cirrhosis within their lifetime. Once HCV infection develops into cirrhosis, hepatocellular carcinoma develops at an annual rate 5–7% [1].

Hepatitis C has some striking clinical features, among others the serum activity of alanine aminotransferase (ALT) is variable and sporadically does not correlate with the histopathological findings of the hepatic biopsies of these patients [2]. In spite of this, serum enzyme activity is hitherto used as the initial marker for detection of liver injury [3] before deciding to perform liver biopsy. In addition, the response to treatment is uncertain, since the therapeutic effect of combination of interferon-alpha and ribavirin, leads to sustained virologic eradication and a positive biochemical response (normalization of serum ALT levels) in about 29%–65% of treated patients [4]. Thus HCV infection is a relevant and unsolved health problem worldwide [5].

The pathogenetic mechanisms for liver injury and fibrosis in chronic hepatitis C are unclear but reported to include immunological liver damage, direct cytotoxicity mediated by different viral products, and induction of oxidative stress [6].

Oxidative stress is a condition known as an inadequate antioxidant protection or excessive production of reactive oxygen species, which is thought to play an important role in the etiology of various disease and in aging [7]. Mammalian tissues have both enzymatic antioxidant defenses (which include superoxide dismutase,

glutathione peroxidase, catalase) and non-enzymatic antioxidants (represented by vitamin C, vitamin E, glutathione, carotenoids, flavonoids, and other antioxidants) [8]. Of particular importance, in HCV infection, the oxidative stress may disrupt the efficiency of the immune response against HCV [9], making cells more susceptible to apoptosis [10], thus facilitating chronicity of hepatitis C.

The potential therapeutic use of antioxidants for the treatment of different disorders, including chronic hepatitis C, has generated a lot of interest [11]. There have been mixed results of antioxidant administration in patients with chronic hepatitis C, with some studies showing beneficial effects [12, 13], whereas others showing no benefit [14]. These conflicting results might in part be attributed to our incomplete understanding of the role of different antioxidants in chronic hepatitis C and the pathophysiological significance of the interrelationship between serum and liver levels of these micronutrients [15].

The aims of our study were to evaluate the possible relationship between aminotransferase levels and markers of oxidative stress in chronic hepatitis C patients. Particularly, we determined whether changes in markers of oxidative stress could be an early response to HCV infection.

Materials and Methods

Study groups

The study was approved by Human Ethical Committee of the Federal University of Santa Maria, protocol number 070/04 and each patient provided written informed consent. All patients with HCV infection had positive HCV RNA by PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) in serum. They were all patients of the University Hospital from the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

Patients were categorized as “normal ALT” (Group I) only if three values for serum ALT obtained, dating back to 6 months were within the limits of normal. Group I comprised 14 patients with ALT levels between 15 and 39 U/L (7 women, 7 men) aged 42.92 ± 3.28 (ranging between 27 and 63 years), this group has ALT activity within the reference values. Group II consisted of 18 patients with ALT activity between 41 and 76 U/L (5 women, 13 men), whose mean age was 37.29 ± 2.35 (ranging between 18 and 61 years), these values are higher than the normal values but are close to the upper limit. Group III comprised 16 patients with notably increase of ALT values, between 81 and 311 U/L (4 women, 12 men), whose mean age was 35.80 ± 2.17 (ranging between 19 and 53 years; Table 1). All these patients were not treated to hepatitis C, neither underwent liver biopsies and ALT values were the mean of at least three quantification done within six months.

Sample collection

Blood (10 mL) was collected by venous arm puncture heparinized vacutainer tubes and the plasma and cells were separated by centrifugation at $4000 \times g$ for 10 min.; the erythrocytes were used for non-protein thiol groups (NP-SH) and catalase (CAT) determinations and the plasma to analyze for vitamin C, glutathione peroxidase (GPx), protein thiol groups (P-SH), thiobarbituric acid-reactive species (TBARS). Samples were obtained from January 2005 to December 2005.

Non-protein and protein thiol groups determination

Erythrocyte nonprotein thiol groups (NP-SH) were determined as described by Ellman [16]. Red blood cells pellet (300 μ l) obtained after centrifugation of heparinized whole blood, was hemolized with 100 μ l triton 10% solution for 10 min.

Then, the protein fraction was precipitated with 200 μ l of 10% trichloroacetic acid followed by centrifugation. The colorimetric assay was carried out in 1M phosphate buffer, pH 7.4. A standard curve using glutathione was constructed in order to calculate the non-protein thiol groups. The NP-SH level was measured at 412 nm and expressed as nmol NP-SH/mL of erythrocyte.

Protein thiol groups (P-SH) were determined as described by Ellman [16]. The colorimetric assay was carried out in 0.85 mL of 0.3 M phosphate buffer, pH 7.0, using 0.05 mL of 5, 5' dithio (bis-nitrobenzoic) acid (DTNB). A standard curve using glutathione was constructed in order to calculate the protein thiol groups. The P-SH level was measured at 412 nm and expressed as nmol P-SH/mL of plasma.

Measurement of thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) in plasma

TBARS were determined in plasma by the method of Ohkawa et al. [17], in which malondialdehyde (MDA), an end-product of fatty acid peroxidation, reacts with thiobarbituric acid (TBA) to form a colored complex. In brief, samples were incubated at 100 °C for 60 min in acid medium containing 0.45% sodium dodecyl sulfate and 0.6% thiobarbituric acid. After centrifugation the reaction product was determined at 532 nm using MDA as standard and the results were expressed as nmol MDA/ mL plasma.

Vitamin C determination

Ascorbic acid determination was performed as described by Jacques-Silva et al. [18]. Plasmas were precipitated with 1 volume of a cold 5% trichloroacetic acid solution followed by centrifugation. An aliquot of 300 μ l of the supernatants were mixed with 2,4-dinitrophenylhydrazine (4.5 mg/mL), CuSO₄ (0.075 mg/mL and

trichloroacetic acid 13.3% (final volume 1 mL) and incubated for 3 h at 37° C. Then 1 mL of H₂SO₄ 65 % (v/v) was added to the medium. The content of ascorbic acid was calculated using a standard curve (1.5 – 4.5 µmol/L ascorbic acid freshly prepared in sulfuric acid) and expressed as µg vitamin C/mL of plasma).

Glutathione peroxidase (GPx) assay

GPx (EC 1.11.1.9) activity determination was assayed by the method of Pagalia and Valentine [19]. In this method, GPx catalyses the oxidation of glutathione in the presence of hydrogen hydroperoxide. Oxidized glutathione is converted to the reduced form in the presence of glutathione reductase and NADPH, while NADPH is oxidized to NADP⁺. In brief, plasma (10µl) was added to the assay mixture (total volume = 500 µl) and the reaction started by the addition of H₂O₂ to give a final concentration of 0.4 mM. Conversion of NADPH to NADP⁺ was monitored continuously at 340 nm for 2 min. GPx activity was expressed as µmol of NADPH oxidized per minute per mL of plasma, using an extinction coefficient 6.22×10^6 for NADPH.

Catalase (CAT) assay

Catalase activity was measured by the method of Aebi [20]. Packed erythrocytes were hemolyzed by adding one hundred volumes of distilled water, then, 20 µl of this hemolyzed sample was added to a cuvette and the reaction was started by the addition of 100 µl of freshly prepared 300 mM H₂O₂ in phosphate buffer (50 mM, pH 7.0; total volume of incubation: 1 mL). The rate of H₂O₂ decomposition was measured spectrophotometrically at 240 nm during 120s. The activity of catalase was expressed as µmol H₂O₂/mL erythrocyte/min.

Others laboratorial Determinations

Anti-HCV antibodies were assayed with a Enzyme Immuno Assay (EIA)-Organon[®]; the presence of HCV-RNA was assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase were determined by automated techniques - Roche[®]. Hemoglobin (Hb) and hematocrit (Ht) were determined in Coulter STKS. The parameters were obtained on the basis of a review of medical records of the patients.

Statistical Analysis

All data were expressed as mean \pm SE. Data were analyzed using multivariate analysis of variance (ANOVA) and the post-hoc comparisons were done using Duncan's multiple test. The Pearson's correlation (r, P) was calculated for all dependent variables. However, we only presented the associations between AST activity and vitamin C, which was statistically significant. A probability value <0.05 was considered the minimum level of statistical significance.

Results

Table 1 summarizes the characteristics of the 48 patients enrolled in the present study. No significant differences were found in age, hematocrit and hemoglobin and in non enzymatic (protein - SH content, nonprotein - SH, thiobarbituric acid reaction) and enzymatic (glutathione peroxidase and catalase activities) markers of oxidative stress measured in blood of these study groups.

One way ANOVA revealed a significant difference in ALT and AST values between study group ($P < 0.05$). Post-hoc comparisons indicated that ALT activity (Figure 1A) was significantly increased in Group II and III when compared to Group I. AST activity was significantly increased only in Group III when compared to Group I (Figure 1 B).

One-way ANOVA and post hoc test revealed that vitamin C content was decreased significantly in Group III ($p=0.001$) and Group II ($p=0.03$) when compared with Group I (Figure 2).

A significant negative correlation between vitamin C level and AST activity were found (Fig. 3A; $r=-0.29$, $P=0.042$) for all patients. Positive correlation between AST and ALT activities were also observed (Fig. 3B; $r= 0.76$, $P= < 0.001$).

Discussion

Alanine aminotransferase (ALT), a sensitive indicator of liver cell injury, has been used to identify patients with liver disease for almost 50 years [21]. Here, we used patients with both normal and elevated ALT without treatment to hepatitis C, to investigate the relationship between aminotransferase levels and the oxidative stress in these patients.

Literature data have indicated that HCV infection is associated with a decrease in antioxidant defenses [15, 22, 23]. Here we have observed that antioxidant enzymes (catalase and GPx), TBARS and protein and NPSH were not modified in HCV infection. In contrast, vitamin C levels were decreased in plasma of HCV patients. Furthermore, we observed that AST was inversely associated with vitamin C levels. These results may indicate that the hepatocellular damage is, at least in part, related to a decrease in the levels of an important endogenous antioxidant. In line with this, Yadav [15] found that increasing hepatic fibrosis is

associated with decreased antioxidant levels. Furthermore, Bandara [24] demonstrated a negative association between vitamin C and disease severity determined by liver biopsies.

Taken together, these results may indicate that vitamin C is a reliable marker for oxidative stress in HCV infection which is related to the severity of infection, as judged by the ALT and AST in plasma. However, whether intervention with controlled high dose vitamin C supplementation will be associated with a retardation of hepatic fibrosis progression in persons with chronic hepatitis C is unknown, but warrants further study. On the basis of these considerations, dietary supplementation with vitamin C could be considered as an adjuvant in disease therapy, since vitamin C is an important component of human nonenzymatic antioxidant defenses [25, 26].

References

1. Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y, et al. Disease progression and hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic viral hepatitis: a prospective observation of 2215 patients. *J Hepatol* 1998; 28: 930–8.
2. Harrison, TR. Chronic hepatitis. *Harrison's principles of internal medicine*. New York: McGraw-Hill 1478 –1483, 1994.
3. Mathurin P, Moussalli J, Cadranel JF, et al. Slow progression rate of fibrosis in hepatitis C virus patients with persistently normal alanine transaminase activity. *Hepatology* 1998; 27: 868–72.
4. Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, 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. *N Engl J Med* 1998; 339: 1493–9.

5. Alter, HJ. Clinical, virological and epidemiological basis for the treatment of chronic non-A, non-B hepatitis. *J Hepatol* 1990; 11: S19–S25.
6. Koziel MJ. Immunology of viral hepatitis. *Am J Med* 1996; 100: 98–109.
7. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 37–56.
8. Cadenas, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors* 1997; 6: 391–97.
9. de Haan JB, Wolvetang EJ, Cristiano F, et al. Reactive oxygen species and their contribution to pathology in Down Syndrome. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 379–402.
10. Buttke TM and Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994; 15: 7–10.
11. Matés JM, Péres-Gómes C, Castro IN. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595–603.
12. Houghlum K, Venkataramani A, Lyche K, Chojkier M. A pilot study of the effects of d-alpha-tocopherol on hepatic stellate cell activation in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1997; 113: 1069–73.
13. Beloqui O, Prieto J, Suarez M, et al. N-acetyl cysteine enhances the response to interferon-alpha in chronic hepatitis C: A pilot study. *J Interferon Res* 1993; 13: 279–82.
14. Ideo G, Bellobuono A, Tempini S, et al. Antioxidant drugs combined with alpha-interferon on chronic hepatitis C not responsive to alpha-interferon alone: A randomized multicenter study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 1203–7.
15. Yadav D, Hertan HI, Schweitzer P, Norkus EP, Pitchumoni CS. Serum and liver micronutrient antioxidants and serum oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2002 97: 2634-9.

16. Ellman, GL. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82-70.
17. Ohkawa H, Ohishi H, Yagi K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351–58.
18. Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EMM, Rocha JBT. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol* 2001; 88: 119–25.
19. Pagalia DE and Valentine WN. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-69.
20. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1974; 105: 121-26.
21. Karmen A, Wroblewski F, Ladue JS. Transaminase activity in human blood. *J Clin Invest* 1955; 34: 126-33.
22. Barbaro G, Di Lorenzo G, Ribersani M, et al. Serum ferritin and hepatic glutathione concentrations in chronic hepatitis C patients related to the hepatitis C virus genotype. *J Hepatol* 1999; 30: 774–82.
23. Jain SK, Pemberton PW, Smith A, et al. Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease. *J Hepatol* 2002; 36: 805–11.
24. Bandara P, George J, McCaughan G, et al. Antioxidant levels in peripheral blood, disease activity and fibrotic stage in chronic hepatitis C. *Liver Int* 2005; 25: 518–26.
25. Proteggente AR, Rehman A, Halliwell B, Rice-Evans C. (2000) Potential problems of ascorbate and iron supplementation: pro-oxidant effect vivo? *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277: 535–40.
26. Lutsenko EA, Cárcamo JM, Golde DW. (2002) Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *J Biol Chem* 2002; 277: 16895–9.

Table 1
Characteristics of study groups

	Group I	Group II	Group III
AST (U/L)	31.05 ± 2.14	38.42 ± 2.24	92.94 ± 10.06
ALT (U/L)	30.97 ± 2.03	58.64 ± 2.46	132.64 ± 13.63
NP – SH (nmol NP-SH/mL erythrocyte)	2191.10 ± 157.24	2329.78 ± 89.51	2010.66 ± 121.49
P - SH (nmol P-SH//mL plasma)	565.86 ± 32.12	568.48 ± 30.66	567.23 ± 37.63
TBARS (nmol MDA/mL plasma)	6.41 ± 0.79	6.40 ± 0.39	6.96 ± 0.90
Catalase (µmol /min/mL erythrocyte)	39.45 ± 1.46	38.69 ± 2.03	38.74 ± 1.84
GPx (µmol NADPH/min/mL plasma)	251.85 ± 28.92	299.42 ± 24.45	238.47 ± 14.29
Vitamin C (µg vitamin C/mL plasma)	21.16 ± 1.41	16.99 ± 1.28*	14.74 ± 1.25*
Hematocrit (%)	41.87 ± 0.74	43.69 ± 0.79	43.13 ± 1.12
Hemoglobin (g/dl)	13.90 ± 0.26	14.57 ± 0.24	14.35 ± 0.40
Age (years)	42.92 ± 3.28	37.29 ± 2.35	35.80 ± 2.17
N (M/F)	14 (7/7)	18 (13/5)	16 (12/4)

Values are the means ± SEM. (*) Denoted p < 0.05 as compared to group I (one-way ANOVA/Duncan).

Figure legends

Figure 1 – ALT (A) and AST (B) activity in plasma of patients in different study groups. Values are expressed as means \pm SEM. The line within the box indicates the median, and the upper and lower limits of the box indicate the 75% and 25% interquartile range. Circles - group I (n = 14); down triangles – group II (n=18) and diamonds – group III (n=16). (*) Denoted $p < 0.05$ as compared to group I (one-way ANOVA/Duncan).

Figure 2 – Vitamin C levels in plasma of individuals of groups I, II and III. Values are expressed as means \pm SEM. The line within the box indicates the median, and the upper and lower limits of the box indicate the 75% and 25% interquartile range. Circles - group I (n = 16); down triangles – group II (n=17) and diamonds – group III (n=15). (*) Denoted $p < 0.05$ as compared to group I (one-way ANOVA/Duncan).

Figure 3 - (A) Significant negative correlation between vitamin C concentrations and AST activity in plasma and (B) Significant positive correlation between AST activity and ALT activity in plasma. The regression line and the 95% confidence interval are plotted.

Figure 1

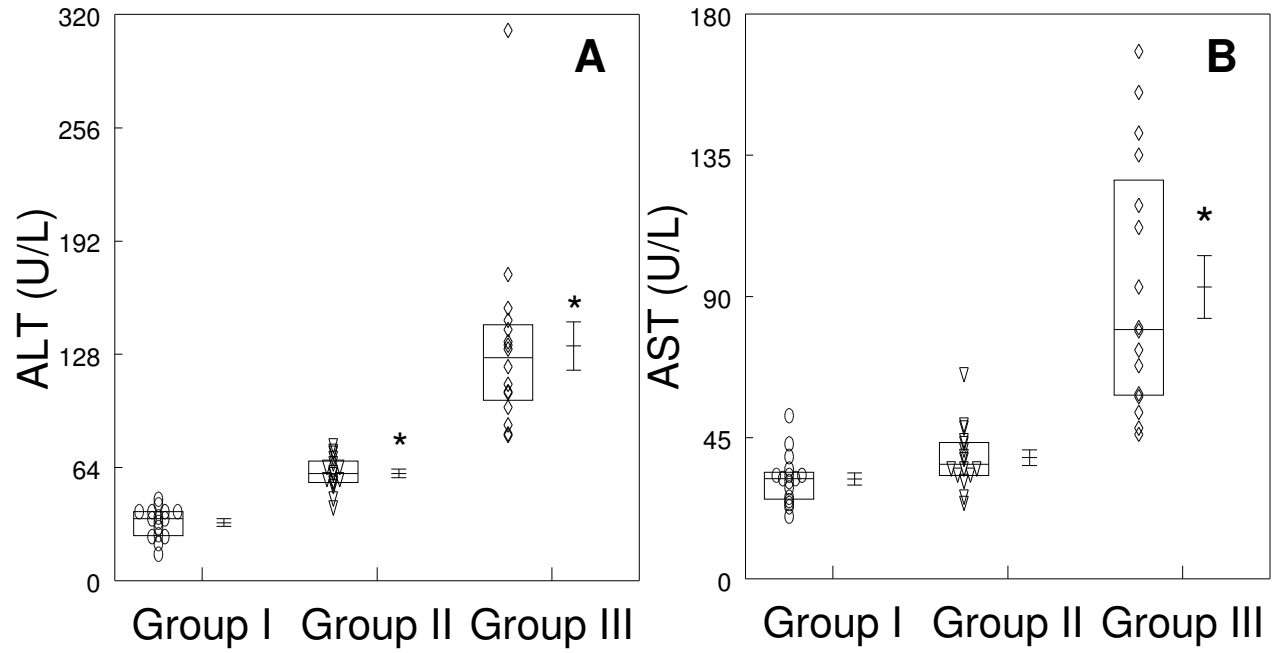


Figure 2

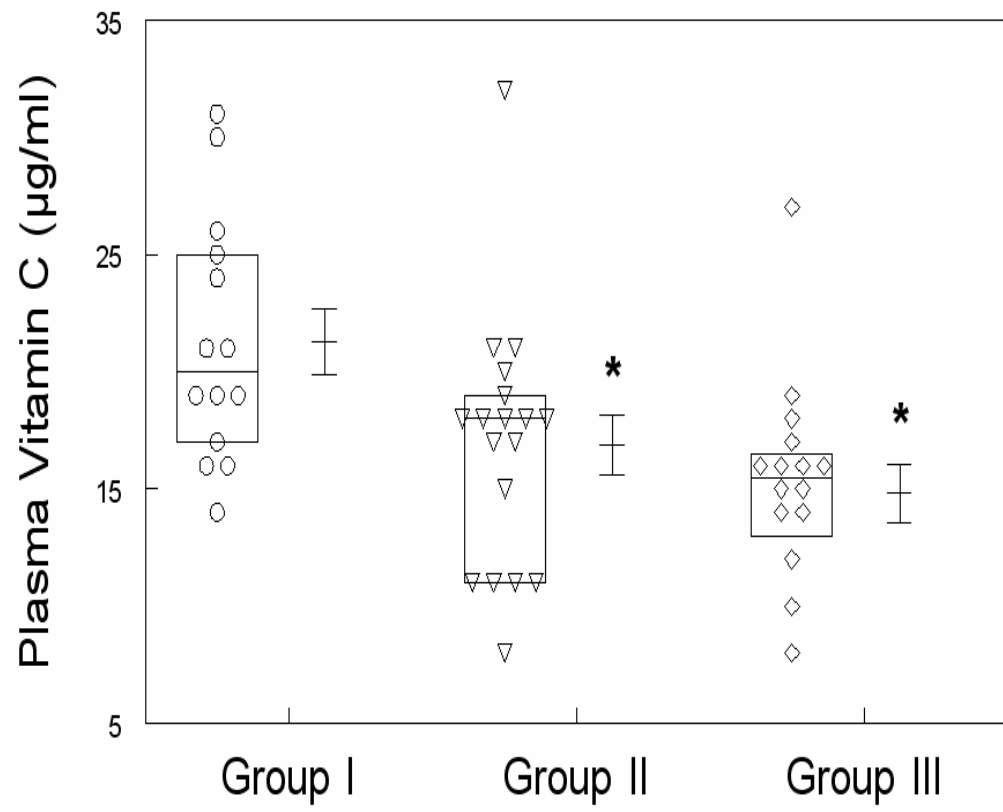
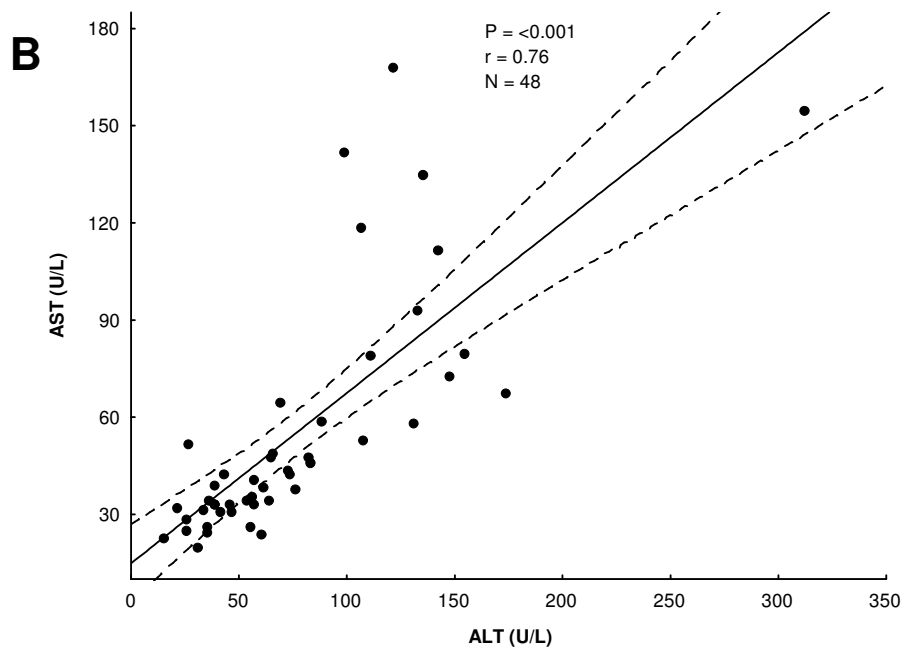
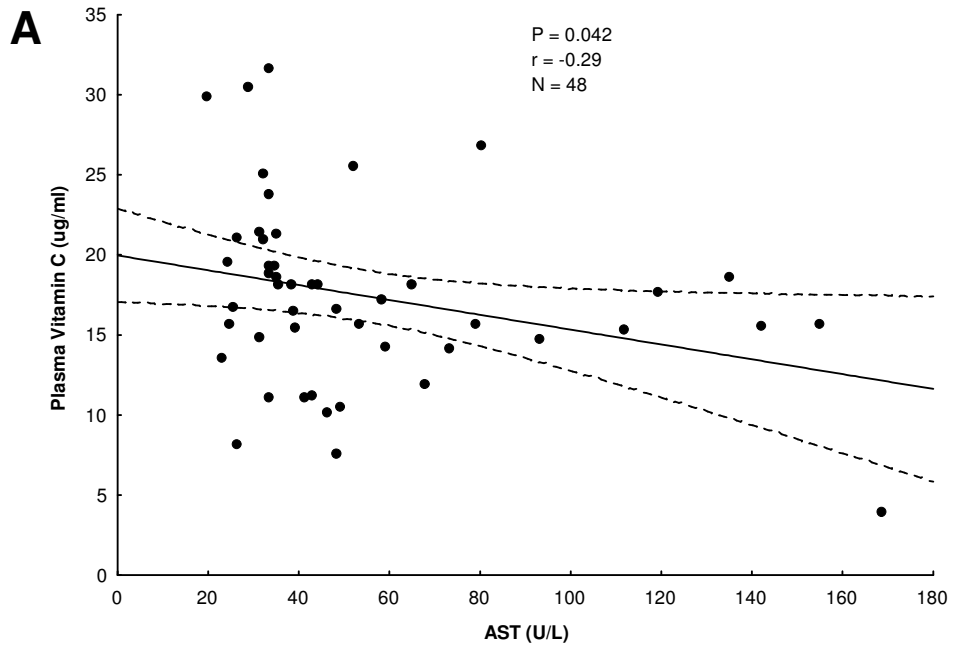


Figure 3



5. DISCUSSÃO

Os mecanismos patogênicos da injúria hepática e fibrose na hepatite C crônica ainda não são totalmente entendidos, mas acredita-se que inclua dano imunológico, citotoxicidade direta mediada pelos produtos virais e indução pelo estresse oxidativo (Koziel, 1996). O estresse oxidativo pode afetar a eficiência da resposta imune (De-Haan et al., 1997), facilitando a cronicidade da infecção. Um efeito protetor para as células é dado pelos antioxidantes, destacando-se sua importante função em colaborar com a defesa imune do hospedeiro. Desse modo, vitaminas conhecidas como antioxidantes, assim como, vitaminas C e E têm sido apontadas em promover a saúde e proteger as funções das células imunes (Beharka et al., 1997).

A vitamina C é o principal antioxidante do plasma, funcionando como a primeira linha de defesa antioxidante (Yamamoto et al., 1998), tendo importante papel na proteção dos lipídeos plasmáticos contra o processo de peroxidação (Frei et al., 1988). Em adição a isso, diversos trabalhos têm indicado os efeitos protetores da vitamina C em diversas partes do sistema imune (Hemila e Douglas, 1999; Leibovitz e Siegel, 1981), assim como nas funções dos fagócitos, proliferação das células T, na produção de interferon (Hemila e Douglas, 1999; Leibovitz e Siegel, 1981) e no aumento da liberação das citocinas pelos linfócitos Th1 e Th2 (Dunstan et al., 2006). Torna-se importante ainda relatar a atividade anti-apoptótica da vitamina C, revelando sua ação na modulação do sistema imune (Valko et al., 2005).

Os resultados deste estudo mostraram que os níveis de vitamina C tendem a diminuir à medida que a atividade das aminotransferases aumenta. Como esta vitamina é considerada uma das respostas iniciais contra o dano oxidativo, pode-se sugerir que esses pacientes estariam em um estágio inicial de estresse oxidativo, já que os demais marcadores não mostraram mudanças significativas com a variação da atividade das aminotransferases. Neste contexto, Frei et al. (1988) sugeriram que a vitamina C poderia ser usada como indicador inicial de estresse oxidativo “in vivo”, baseado na oxidação imediata deste antioxidante frente à estimulação desencadeada por leucócitos ativados, que são importantes células envolvidas no processo inflamatório.

Na patogênese da hepatite C, além do processo inflamatório, que envolve principalmente a atividade dos fagócitos, soma-se a resposta imune do hospedeiro contra a infecção viral, recrutando principalmente as células T com suas citocinas. Como mencionado anteriormente, as ações da vitamina C colaboram na defesa imune do hospedeiro em várias etapas, sendo considerada um modulador da resposta imune. Como decorrência disso, à medida que aumenta a ineficiência da resposta imune do hospedeiro contra o HCV, ocorre a progressão da doença, e a vitamina C pode ir sendo consumida, como um auxílio, na tentativa da eliminação viral. Como em nossos resultados houve uma associação negativa entre a vitamina C e a atividade das aminotransferases, sugerimos a inclusão da suplementação com vitamina C ao protocolo tradicional de tratamento da hepatite C, principalmente devido a sua função imuno-moduladora. De acordo com isso, Groenbaek et al. (2005) relataram uma inversa relação entre a carga viral do HCV com a vitamina C, recomendando que o aumento na dieta ou suplementação com antioxidantes poderia reduzir a progressão da doença hepática vista na hepatite C.

Outra observação importante deste estudo foi a inversa correlação entre os níveis de vitamina C com a atividade da AST, mas não com a ALT. Essa correlação pode ser devida a AST refletir a maior intensidade do um dano hepático quando comparada a ALT (Gitlin, 1982), já que a primeira enzima é localizada na mitocôndria, e a segunda encontra-se no citoplasma do hepatócito (Boyde, 1961), havendo a necessidade do consumo da vitamina C somente quando o dano hepático fosse refletido pelo aumento dos níveis de AST no plasma. Também é possível que a síntese da ALT diminua nos hepatócitos que estão sofrendo apoptose, justificando, dessa maneira, o não correspondente aumento em seus níveis com a extensão da lesão, já que na infecção pelo vírus C ocorre morte celular via apoptose e necrose (Shaib et al., 2000).

Na mesma linha de nosso trabalho, níveis diminuídos de vitamina C no plasma têm sido verificados em pacientes com hepatite C, quando comparados a indivíduos saudáveis (Jain et al., 2002). Bandara et al (2005) verificou uma correlação negativa entre vitamina C, atividade inflamatória e estágio de fibrose, através da biópsia hepática.

Dessa forma, se a intervenção com suplementação com altas doses de vitamina C pode ser associada com retardo da progressão da fibrose hepática nestes pacientes ainda não é conhecido, necessitando futuros estudos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo indicaram que os níveis de vitamina C decrescem com a atividade aumentada das aminotransferases.

Os resultados também mostraram que, excetuando-se a vitamina C, os demais marcadores de estresse oxidativo não se constituíram em indicadores precoces do dano hepático causado pelo HCV.

7. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- Realizar estudos em pacientes com a infecção pelo vírus C mais avançada, com o objetivo de ver o comportamento da vitamina C nestes indivíduos;
- Realizar estudos em pacientes em tratamento para a hepatite C, para verificar os marcadores de estresse oxidativo no decorrer da terapia;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI, A. et al. Prevalence of liver disease in a population of asymptomatic persons with hepatitis C virus infection. **Annals of Internal Medicine**, 137, 961–4, 2002.

ALBERTI, A. Towards more individualised management of hepatitis C virus patients with initially or persistently normal alanineaminotransferase levels. **Journal of Hepatology**, 42, 266–74, 2005.

ALTER, H.J. Discovery of non-A, non-B hepatitis and identification of its etiology. **The American Journal Medicine**, 107 (6B), 16S-20S, 1999.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, 93, 1464–76, 1999.

BACON, B.R. Treatment of patients with hepatitis C and normal serum aminotransferase levels. **Hepatology**, 36, S179–84, 2002.

BACH N.; THUNG, S. N.; SCHAFFNER, F. The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: a comparative analysis. **Hepatology**, 15, 572-77, 1992.

BANDARA, P. et al. Antioxidant levels in peripheral blood, disease activity and fibrotic stage in chronic hepatitis C. **Liver International**, 25: 518–526, 2005.

BARBA, G. et al. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 94, 1200–1205, 1997.

BARKE, G. The CTL's kiss of death. **Cell**, 81, 9–12, 1995.

BEHARKA, A. et al. Vitamin E status and immune function. **Methods in Enzymology**, 282:247–63, 1997.

BEINKER, N.K. et al. Threshold effect of liver iron content on hepatic inflammation and fibrosis in hepatitis B and C. **Journal of Hepatology**, 25, 633–8, 1996.

BELOQUI, O. et al. N-acetyl cysteine enhances the response to interferon-alpha in chronic hepatitis C: A pilot study. **Journal of Interferon Research**, 13, 279–82, 1993.

BERNHARD, M. et al. Time course of total cysteine, glutathione and homocysteine in plasma of patients with chronic hepatitis C treated with interferon-alpha with and without supplementation with N-acetylcysteine. **Journal of Hepatology**, 28, 751–55, 1998.

BONIZZI, G. et al. Reactive oxygen intermediate-dependent NF-kappaB activation by interleukin-1beta requires 5-lipoxygenase or NADPH oxidase activity. **Molecular and Cellular Biology**, 19, 1950–160, 1999.

BONKOVSKY, H.L.; BANNER, B.F.; ROTHMAN, A.L. Iron and chronic viral hepatitis. **Hepatology** 25, 759–68, 1997.

BONKOVSKY, H.L. et al. Iron and HFE or TfR1 mutations as comorbid factors for development and progression of chronic hepatitis C. **Journal of Hepatology**, 37, 848–54, 2002.

BOUFFARD, P. et al. Hepatitis C virus is detected in a monocyte/macrophage subpopulation of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. **The Journal of Infectious Diseases**, 166, 1276–80, 1992.

BOYA, P. et al. Antioxidant status and glutathione metabolism in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C. **Journal of Hepatology**, 31, 808–14, 1999.

BOYDE, T.R.C.; LATNER, A.L. Starch-gel electrophoresis of transaminase in human tissue extracts and sera. **The Biochemical Journal**, 82:51, 1961.

BRANDÃO, A.B. et al. Diagnóstico da hepatite C na Prática Médica – Revisão de Literatura. **Revista Panamericana Salud Publica**, 9 (3), 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas, Hepatite Viral Crônica C - Interferon-alfa, Interferon-alfa Peguilado, Ribavirina**, 2002.

BUREAU, C. et al. Non-structural 3 protein of hepatitis C virus triggers an oxidative burst in human monocytes via activation of NADPH oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, 276, 23077–83, 2001.

BUTTKE, T.M.; SANDSTORM P.A. Oxidative stress as a member of apoptosis. **Immunology Today**, 15:7–10, 1994.

CADENAS, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **Biofactors**, 6: 391–97, 1997.

CADRANEL, J. F.; RUFAT, P.; DEGOS, F. Practice of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEF). **Hepatology**, 32, 477–81, 2000.

CHOO, Q.L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, 244, 359-62, 1989.

COOKE, M. S. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **FASEB Journal**, 17: 1195–214, 2003.

DAVIS, G.L. et al. Clinical predictor of response to recombinant Interferon- α treatment in patients with chronic non-A non-B hepatitis (hepatitis C). **Journal of Virology and Hepatology**, 1: 55-63, 1994.

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**, 339: 1493–9, 1998.

DE HAAN, J.B. et al. Reactive oxygen species and their contribution to pathology in Down Syndrome. **Advances in Pharmacology**, 38:379–402, 1997.

DE MARIA, N. et al. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. **Free Radical Biology & Medicine**, 21, 291–5, 1996.

DESMET, V.J. et al. Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. **Hepatology**, 19, 15 13-20, 1994.

DESIDERI, A.; FALCONI, M. Prokaryotic Cu, Zn superoxidies dismutases. **Biochemical Society Transactions**, 31, 1322–25, 2003.

DI BISCEGLIE, A.M. et al. Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. **Gastroenterology**, 102, 2108–13, 1992.

DIENSTAG, J. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. **Hepatology** 36 (1), 52–60, 2002.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, 82, 47–95, 2002.

DUMOULIN, F. L. et al. Hepatitis C virus core protein does not inhibit apoptosis in human hepatoma cells. **European Journal of Clinical Investigation**, 29, 940–946, 1999.

DUNSTAN, J. A.; et al. Associations between antioxidant status, markers of oxidative stress and immune responses in allergic adults. **Clinical and Experimental Allergy**, 36, 993–1000, 2006.

FARINATI, F. et al. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. **Journal of Hepatology**, 22, 449–56, 1995.

FERRARI, C. et al. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, 31 (1), 31–38, 1999.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 43, 61-8, 1997.

FRIDOVICH. Biological effects of the superoxide radical. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 247, 1–11, 1986.

FREI, B.; STOCKER R.; AMES, B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 85, 9748-52, 1988.

FUJIE, H. et al. Steatosis and intrahepatic hepatitis C virus in chronic hepatitis. **Journal of Medical Virology**, 59, 141–45, 1999.

GITLIN, N. The serum glutamic oxaloacetic transaminase/serum glutamic pyruvic transaminase ratio as a prognostic index in severe acute viral hepatitis. **The American Journal of Gastroenterology**, 77, 2-4, 1982.

GOODMAN, Z.D.; ISHAK, K.G. Histopathology of hepatitis C virus infection. **Seminars in Liver Disease**, 15, 70–81, 1995.

GOTTO, J.; DUSHEIKO, G. Hepatitis C and treatment with pegylated interferon and ribavirin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 36, 1874-77, 2004.

GROENBAEK, K. et al. Viral load is a negative predictor of antioxidant levels in hepatitis C patients. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, 37:686–689, 2005.

HABER, M.M. et al. Relationship of aminotransferases to liver histological status in chronic hepatitis C. **The American Journal of Gastroenterology**, 90, 1250-7, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **The Biochemical Journal**, 219, 1–14, 1984.

HARRISON, D. et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **American Journal of Cardiology**, 91: 7A–11A, 2003.

HARRISON, T.R. Chronic hepatitis. **Harrison's principles of internal medicine**. New York: McGraw-Hill; 1478-1483, 1994.

HEALEY, C.J.; CHAPMAN, R.W.G.; FLEMING, K.A. Liver histology in hepatitis C infection: A comparison between patients with persistently normal or abnormal transaminases. **Gut**, 37,274-g, 1995.

HEMILA, H.; DOUGLAS, R.M. Vitamin C and acute respiratory infections. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease : The Official Journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, 3, 756–761, 1999.

HOOFNAGLE, J.H. Management of hepatitis C: current and future perspectives. **Journal of Hepatology**, 31(1), 264-68, 1999.

HOUGLUM, K. et al. A pilot study of the effects of D-alpha-tocopherol on hepatic stellate cell activation in chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, 113, 1069–73, 1997.

IDEO G. et al. Antioxidant drugs combined with alpha-interferon on chronic hepatitis C not responsive to alpha-interferon alone: A randomized multicenter study. **European Journal Gastroenterology and Hepatology**, 11, 1203–7, 1999.

IKEDA, K. et al. Disease progression and hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic viral hepatitis: a prospective observation of 2215 patients. **Journal of Hepatology**, 28, 930–8, 1998.

INOUE, M. et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Current Medicinal Chemistry**, 10, 2495–2505, 2003.

JAIN, S. K. et al. Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease. **Journal of Hepatology**, 36: 805–11, 2002.

JAMAL, M.M. et al. Clinical features of hepatitis C-infected patients with persistently normal alanine aminotransferase levels in the southwestern United States. **Hepatology**, 30, 1307–11, 1999.

KAKHLON, O.; CABANTCHIK, Z.I. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. **Free Radical Biology & Medicine**, 33, 1037–46, 2002.

KLAUNIG, E. et al. Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis, in: TAYLOR & FRANCIS, **Free Radical Toxicology**, London: K.B. Wallace (Ed.), 1997, p. 375–400.

KOIKE, K.; MORIYA, K.; KIMURA, S. Role of hepatitis C virus in the development of hepatocellular carcinoma: transgenic approach to viral hepatocarcinogenesis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 4, 394-50, 2002.

KORENAGA, M. et al. Hepatitis C Virus Core Protein Inhibits Mitochondrial Electron Transport and Increases Reactive Oxygen Species (ROS) Production. **The Journal of Biological Chemistry**, 280 (45), 37481–488, 2005.

KOIKE, K.; MIYOSHI, H. Oxidative stress and hepatitis C viral infection. **Hepatology Research**, 34, 65–73, 2006.

KOZIEL, M.J. Immunology of viral hepatitis. **The American Journal of Medicine**, 100: 98–109, 1996.

KOZIEL, M.J. Cytokines in viral hepatitis. **Seminars in Liver Disease**, 19, 157–69, 1999.

LEIBOVITZ, B.; SIEGEL, B.V. Ascorbic acid and the immune response. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 135, 1–25, 1981.

LARREA, E. et al. Superoxide dismutase in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Free Radical Biology & Medicine**. 24, 1235–41, 1998.

LIEBER, C. S. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. **Advances in Pharmacology**. 38: 601–28, 1997.

MARRA, F et al. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulate fibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cell. **Gastroenterology**, 119, 466–78, 2000.

MARSHALL, M.; KAPLAN, M.D. Alanine Aminotransferase Levels: What's; Normal? **Annals of Internal Medicine**, 137:49-51, 2002.

MATHURIN, P. et al. Slow progression rate of fibrosis in hepatitis C virus patients with persistently normal alanine transaminase activity. **Hepatology**, 27, 868–72, 1998.

MC GILL, D.B. et al. A 21- year experience with major hemorrhage after percutaneous liver biopsy. **Gastroenterology**, 99, 1396–400, 1990.

MC HUTCHISON, J.G. et al. Predicting response to initial therapy with interferon plus ribavirin in chronic hepatitis C using serum HCV RNA results during therapy. **Journal of Viral Hepatitis**, 8: 414-420, 2001.

MORADPOUR, D. et al. Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. **Virology**, 222, 51–63, 1996.

MORIYA, K. et al. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. **The Journal of General Virology**, 78, 1527–31, 1997.

MORIYA, K. et al. Oxidative Stress in the Absence of Inflammation in a Mouse Model for Hepatitis C Virus-associated Hepatocarcinogenesis. **Cancer Research**, 61, 4365–70, 2001.

NAGATA, S. Apoptosis by death factor. **Cell**, 88, 355–65, 1997.

NAKAMOTO, Y. et al. Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma. **The Journal of Experimental Medicine**, 1998.

NAPOLI, J. et al. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. **Hepatology**, 24, 759–65, 1996.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE PANEL. MANAGEMENT OF HEPATITIS C. **Hepatology**, 26: 2S – 10S, 1997.

OKANOUE, T. et al. A followup study to determine the value of liver biopsy and need for antiviral therapy for hepatitis C virus carriers with persistently normal serum aminotransferase. **Journal of Hepatology**, 43, 599–605, 2005.

OKUDA, M. et al. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. **Gastroenterology**, 122, 366–75, 2002.

PARADIS, V. et al. In situ detection of lipid peroxidation in chronic hepatitis C: Correlation with pathological features. **Journal of Clinical Pathology**, 50, 401–6, 1997.

PAROLA, M.; ROBINO, G Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, 35: 297–306, 2001.

PASTORE, A. et al. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, 333, 19–39, 2003.

PAWLOTSKY, J.M. Diagnostic tests for hepatitis C. **Journal of Hepatology**, 31: 71–79, 1999.

PAWLOTSKY, J.M. et al. What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? **Hepatology**, 27, 1700–02, 1998.

PERSICO, M. et al. Natural history of hepatitis C virus carriers with persistently normal aminotransferase levels. **Gastroenterology**, 118, 760–4, 2000.

PICCININO, F. et al. Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. **Journal of Hepatology**, 2, 165–73, 1986.

POLI, G. et al. Oxidative stress and cell signaling. **Current Medicinal Chemistry**, 11, 1163–82, 2004.

POYNARD, T. et al. Randomised trial of interferon α -2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon α -2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. **Lancet**, 352: 1426-32, 1998.

PRADAT, P. et al. Predictive value of ALT levels for histologic findings in chronic hepatitis C: European collaborative study. **Hepatology**, 36, 973–7, 2002.

PRYOR, W.A. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, **Free Radical Biology & Medicine**, 28, 141–164, 2000.

RADISKY, D.C.; KAPLAN, J. Iron in cytosolic ferritin can be recycled through lysosomal degradation in human fibroblasts. **The Biochemical Journal**, 336, 201–5, 1998.

RAY, R.B. et al. Inhibition of Tumor Necrosis Factor (TNF- α)-mediated Apoptosis by Hepatitis C Virus Core Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, 273 (4), 2256–59, 1998.

REGEV, A. et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. **The American Journal of Gastroenterology**, 97, 2614–8, 2002.

RETSKY, K.L. et al. Inhibition of copperinduced LDL oxidation by Vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. **Free Radical Biology & Medicine**, 26, 90–98, 1999.

RIGGIO, O. et al. Iron overload in patients with chronic viral hepatitis: how common is it? **The American Journal of Gastroenterology**, 92, 1298–301, 1997.

ROMERO, M. J. et al. Serum malondialdehyde: Possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. **Free Radical Biology & Medicine**, 25, 993–7, 1998.

ROSEN, H.R.; GRETCH, D.R. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. **Molecular Medicine Today**, 5, 393-99, 1999.

SABILE, A. et al. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. **Hepatology**, 30, 1064–1076, 1999.

SANTOLINI, E.; MIGLIACCIO, G.; LA MONICA N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. **Journal of Virology**, 68, 3631–3641, 1994.

SHAIB, Y.H.; VEGA, K.J.; JAMAL, M.M. Approach to patients with hepatitis C and persistently normal alanine transferase levels. **Clinical Perspectives in Gastroenterology**, 252– 8, 2000.

SHIMODA, R. et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. **Cancer Research**, 54, 3171–2, 1994.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. **Consenso sobre condutas nas hepatites virais B e C**, São Paulo – SP, 2005.

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

SUAREZ, M. et al. Glutathione depletion in chronic hepatitis C. **International Hepatology Communications**, 1, 215-21, 1993.

SZABÓ, E. et al. Similarities and differences in hepatitis B and C virus induced hepatocarcinogenesis. **Pathology Oncology Research**. 10 (1), 2004.

TASSOPOULOS, N.C. Treatment of patients with chronic hepatitis C and normal ALT levels. **Journal of Hepatology**, 31, 193-96, 1999.

THIMME, R. et al. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. **The Journal of Experimental Medicine**, 10, 1395-1406, 2001.

TSAI, S.L. et al. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implication for hepatitis C virus chronicity. **Hepatology**, 25, 449–58, 1997.

VALKO, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 266, 37–56, 2004.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39, 44–84, 2007.

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

VAUX, D.L., STRASSER, A. The molecular biology of apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 93, 2239–44, 1996.

YADAV, D. et al. Serum and Liver Micronutrient Antioxidants and Serum Oxidative Stress in Patients With Chronic Hepatitis C. **The American Journal of Gastroenterology**, 97, 2002.paginas

YAMAMOTO, Y. et al. Oxidative stress in patients with hepatitis, cirrhosis, and hepatoma evaluated by plasma antioxidants. **Biochemical Biophysical Research Communications**. 247, 166–70, 1998.

YASUI, K. et al. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. **Journal of virology**, 72, 6048–55, 1998.

YOU, W.C. et al. Gastric cancer: Helicobacter pylori, serum Vitamin C, and other risk factors. **Journal of the National Cancer Institute**, 92, 1607–12, 2000.