

**Universidade de Brasília**  
**Faculdade de Medicina**  
**Pós-Graduação em Patologia Molecular**

**Aluno: José Eduardo Trevizoli**

**Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis da Rocha Neves**

**Hepatite C em pacientes portadores de  
insuficiência renal crônica em  
hemodiálise: aspectos histológicos,  
bioquímicos e virológicos**

**Brasília, agosto de 2008**

"Onde houver amor pela arte da medicina, também haverá amor pela humanidade."

Hipócrates, 400 a.C.

## **Dedicatória**

À Elisa, minha querida esposa e companheira de vida, por todas as nossas conquistas, por todo o seu amor, carinho, incentivo e compreensão.

À Natalia e Isadora, minhas adoráveis filhas, fontes de amor e alegria, pela compreensão e apoio constante.

Aos meus pais, Caetano (em memória) e Lucila que me deram educação e possibilidade de escolher novos caminhos.

Aos meus irmãos, Antônio Henrique, Lígia Maria e Elisabete

Aos meus cunhados Serafim, Claudir, Hooock, Mônica e Maria Clara

Aos meus sobrinhos e à toda minha família

Apesar da distância física de alguns, todos estão sempre presentes na minha mente e no meu coração.

Aos meus sogros, Bias e Abadia, por todo o apoio em momentos importantes.

## Agradecimentos

- Ao Dr. Francisco de Assis da Rocha Neves, que com amizade, dedicação e conhecimento me propiciou e incentivou essa conquista.
- Ao Dr. Columbano Junqueira Neto, Chefe da Unidade de Gastroenterologia, Mauro Birche de Carvalho, Coordenador de Gastroenterologia da Secretaria de Saúde do Distrito Federal pela amizade, apoio, cooperação e compreensão durante a elaboração dessa pesquisa.
- Às Dras Cláudia Renata Fernandes Martins (em memória), Regina Maria Santos de Amorim, Maria Beatriz e Lara Franciele Ribeiro Velasco por todo o trabalho na realização da biologia molecular.
- À Dra. Raissa de Paula Menezes pelo intenso trabalho de revisão histológica.
- Aos Drs. Afonso da Rocha Campos, Liliana Sampaio Mendes, Luciana Teixeira Campos Cella, Ricardo Jacarandá e Técio Araújo Couto pela amizade, apoio incondicional e cooperação na elaboração deste trabalho.
- Aos residentes e médicos da Unidade de gastroenterologia pelo apoio e compreensão durante todo o período de realização dessa pesquisa.
- Ao Dr. José Roberto de Deus Macedo pelo trabalho de análise estatística.
- Ao Dr César Augusto Melo e Silva pelo apoio na configuração e editoração desta, na receptividade e no carinho dispensado.
- Aos Diretores das unidades de hemodiálise do distrito federal, Dra. Maria Letícia Reis, Dra. Gracy Ara Ferreira Nery, Dr. Sérgio Raimundini Cavechia, Dr. Rafael Aguiar Barboza e Dr. Aluisio Costa e Silva pela permissão e cooperação na realização deste trabalho.
- Aos diretores e funcionários das unidades de hemodiálise que permitiram a realização deste trabalho, sempre com dedicação e presteza nas informações dos pacientes.
- À Dra. Maria de Fátima Brito Portela, diretora da Fundação Hemocentro e aos seus funcionários pela realização dos testes sorológicos e pela maneira cordial e atenciosa que me receberam.

- Ao Dr. Plínio Caldeira Brant, aquele que me ensinou o raciocínio clínico e a busca da perfeição na relação médico paciente.
- Aos pacientes portadores de insuficiência renal em tratamento de hemodiálise e àqueles portadores do vírus da hepatite C, que participaram dessa pesquisa. (A eles, objeto de todo o nosso trabalho e a quem) espero que algum benefício lhes possa ser revertido.

*“A verdade em medicina, é um objetivo que ninguém consegue alcançar, e tudo que está nos livros vale muito menos do que a experiência de um médico que reflete e raciocina.”*

*Abu Bakr al-Razi*

## Resumo

**Justificativa:** O grau de progressão da doença hepática nos pacientes portadores de insuficiência renal crônica (IRC) em tratamento regular de hemodiálise não está definido. Existem poucos estudos na literatura, e aqueles que avaliaram histologia hepática apresentam resultados contraditórios.

**Objetivos:** O objetivo desse estudo foi comparar os aspectos clínicos, bioquímicos e de histologia hepática dos pacientes em hemodiálise com aqueles com função renal normal. **Material e Métodos:**

Foi realizado um estudo caso-controle com 36 pacientes em hemodiálise e 37 pacientes com função renal normal. Os dois grupos apresentavam pesquisa do RNA do Vírus da hepatite C e foram emparelhados com relação a sexo, idade e tempo estimado de infecção. Além disso, foi realizado um estudo prospectivo para avaliar a taxa de progressão da fibrose hepática. Nos pacientes portadores de IRC em hemodiálise que não foram submetidos ao transplante renal num período de pelo menos 03 anos foi realizada uma segunda biópsia hepática e comparado com os achados histológicos da primeira. **Resultados:** Os pacientes infectados pelo VHC em hemodiálise apresentaram menores níveis de enzima hepática (alanina aminotransferase) e menor carga viral que os pacientes com função renal normal. A presença de qualquer grau de fibrose hepática pela classificação de Metavir foi significativamente mais freqüente nos pacientes com função renal normal (73%) quando comparados com aqueles em hemodiálise (47.2%;  $p < 0.025$ ). Da mesma forma, o grau de atividade inflamatória foi mais intenso nos pacientes com função renal normal (59.5%) do que naqueles em hemodiálise (27.7%;  $p = 0.003$ ). Na análise multivariada, a presença de atividade inflamatória grave com o único fator de risco para a ocorrência de fibrose hepática ( $p < 0.001$ ) e o risco de inflamação grave (Metavir graus 2-4) foi quatro vezes menor nos pacientes em hemodiálise (OR=0.23,  $p < 0.004$ ). Em nove pacientes em hemodiálise que permaneceram em hemodiálise, uma segunda biópsia foi realizada com intervalo médio de 66 meses (40-88). Houve progressão de pelo menos um ponto na escala de fibrose do sistema Metavir em três pacientes, com taxa de progressão direta de 0.15/ano. **Conclusões:** A menor atividade inflamatória tecidual hepática e bioquímica observada nos pacientes renais crônicos sugere que a hemodiálise e a uremia podem atuar como fator protetor na doença causada pelo vírus da hepatite C.

**Palavras-Chave:** Hepatite crônica C; insuficiência renal; hemodiálise; biópsia hepática; fibrose hepática.

## Abstract

**Background:** The severity of liver disease among hepatitis C patients on hemodialysis is controversial. **Objective:** The aim of this study was to compare the clinical, biochemical and liver histological characteristics of HCV in hemodialysis patients with those with normal renal function. **Methods:** A case-control study was carried out with 36 HCV patients on hemodialysis and 37 HCV patients with normal renal function matched for gender, age at infection, and estimated time of infection. Moreover, a prospective study was performed to compare two liver biopsies obtained at an interval of at least three years in hemodialysis patients who did not receive a kidney transplant. **Results:** HCV patients on hemodialysis had lower levels of alanina aminotransferase and lower viral load. Hepatic fibrosis was significantly higher in the patients with normal renal function (73%) than in hemodialysis patients (47,2%  $p<0.025$ ) as well as inflammatory activity (control group 59.5% vs. hemodialysis patients 27.7%,  $p=0.003$ ). In addition, the risk of tissue inflammation was four times lower in hemodialysis patients (OR=0.23,  $p<0.004$ ) and severe inflammatory activity on biopsy was the only independent risk factor for fibrosis ( $p<0.001$ ). In two liver biopsies performed at a mean interval of 66 months (40-88) in nine hemodialysis patients, fibrosis progressed 1 point (Metavir scale) only in three patients (mean direct progression rate 0.15/year). **Conclusion:** The lower biochemical and inflammatory activities observed in hemodialysis patients suggest that hemodialysis and uremia may have a protective role against progression of the disease caused by HCV.

**Key-words:** : chronic hepatitis C; kidney failure; hemodialysis; liver biopsy; liver fibrosis; hepatic fibrosis.

# Sumário

<b>Dedicatória</b>	<b>ii</b>
<b>Agradecimentos</b>	<b>iv</b>
<b>Resumo</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>x</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>xii</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Interação Vírus - Hospedeiro . . . . .	2
1.2 Resposta Imune . . . . .	7
1.2.1 Imunidade Humoral . . . . .	7
1.2.2 Imunidade Celular . . . . .	7
1.2.3 Fibrose Hepática . . . . .	10
1.3 Formas Clínicas do Vírus da Hepatite C . . . . .	13
1.3.1 Hepatite Aguda . . . . .	13
1.3.2 Hepatite Crônica . . . . .	14
1.4 Hepatite C e Insuficiência Renal Crônica . . . . .	15
1.4.1 Formas de transmissão . . . . .	15
1.4.2 Epidemiologia e diagnóstico . . . . .	15
1.4.3 Evolução Clínica . . . . .	16
<b>2 Objetivos</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivo Geral . . . . .	19
2.2 Objetivos Específicos . . . . .	19
<b>3 Pacientes e Métodos</b>	<b>20</b>
3.1 Delineamento do estudo . . . . .	20

---

3.2	Pacientes . . . . .	20
3.3	Método . . . . .	22
3.4	Análise estatística . . . . .	36
<b>4</b>	<b>Resultados</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>Discussão</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Conclusões</b>	<b>74</b>
	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>76</b>
	<b>Anexos</b>	<b>98</b>

## Lista de Figuras

1	Estrutura do vírus da hepatite C . . . . .	2
2	Estágio de fibrose hepática (Metavir) em pacientes portadores de IRC em hemodiálise . . . . .	40
3	Distribuição intralobular do processo inflamatório hepático e grau de atividade inflamatória nos pacientes em hemodiálise. . . . .	40
4	Graus de atividade inflamatória (Metavir) nos pacientes em hemodiálise . . .	41
5	Graus de siderose hepática nos pacientes em hemodiálise . . . . .	42
6	Distribuição do estágio de fibrose hepática (Metavir) nos pacientes infectados pelo vírus da hepatite C em hemodiálise e com função renal normal . . . . .	47
7	Distribuição do grau de atividade inflamatória (Metavir) nos pacientes infectados pelo vírus da hepatite C em hemodiálise e com função renal normal . .	47

## Lista de Tabelas

1	Critérios de interpretação da pesquisa qualitativa de RNA do VHC . . . . .	27
2	Seqüência de oligonucleotídeos usados para amplificação da região 5'UTR do genoma do HCV . . . . .	30
3	Seqüência de oligonucleotídeos usados para amplificação da região NS5B do genoma do HCV . . . . .	31
4	Seqüência de oligonucleotídeos usados para amplificação da região do envelope genoma do HCV . . . . .	32
5	Características gerais dos pacientes em hemodiálise . . . . .	38
6	Marcadores histológicos de hepatite crônica C nos pacientes em hemodiálise .	41
7	Análise univariada dos fatores associados com fibrose hepática (Metavir - estágios 1-4) em pacientes em Hemodiálise . . . . .	43
8	Análise univariada dos fatores associados com fibrose hepática (Metavir - estágios 1-4) em pacientes em Hemodiálise . . . . .	44
9	Alterações hepáticas em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C em hemodiálise e com função renal normal . . . . .	46
10	Análise univariada dos fatores de risco associados com fibrose (Metavir - estágios 1-4) em todos os pacientes . . . . .	49
11	Análise multivariada dos fatores associados com fibrose hepática . . . . .	51
12	Análise univariada dos fatores de risco associados à atividade inflamatória grave (Metavir - graus 2 e 3) em todos os pacientes . . . . .	53
13	Análise multivariada dos fatores associados à atividade inflamatória grave (Metavir - graus 2 e 3) em todos os pacientes . . . . .	54

## Lista de Abreviaturas

AI – Atividade inflamatória

ALT – Alanina aminotransferase

Anti-HBc – Anticorpo contra o antígeno core do vírus da hepatite B

Anti-HCV – Anticorpo contra o vírus da hepatite C

Anti-HIV – Anticorpo contra o vírus da imunodeficiência humana

BD - - Bilirrubina direta

bDNA – DNA ramificado ou branched DNA

BT – Bilirrubina total

CD – Células dendríticas

CO – *Cut-off*

DM – Diabetes mellitus

CHC – Carcinoma hepatocelular

CTGF – Fator de crescimento do tecido conjuntivo

DO – Densidade ótica

DF – Distrito Federal

E1, E2 – Regiões estruturais do HCV (envelope)

ELISA 1 – Ensaio imunoenzimático de primeira geração

ELISA 2 – Ensaio imunoenzimático de segunda geração

ELISA 3 – Ensaio imunoenzimático de terceira geração

FHB – Fundação Hemocentro de Brasília

FRN – Função renal normal

HBsAg – Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HD – Hemodiálise

HVR1 e 2 – Região hipervariável 1 e 2

HSC – Células estelares (*stellate cells*)

IFN – Interferon

IL – Interleucinas

IMC – Índice de massa corporal

IRES – Sítio de entrada interno para ribossomos (*Internal Ribosomal Entry Site*)

IRC – insuficiência renal crônica

LIPA – *Line probe assay*

MHC – Complexo maior de histocompatibilidade

MMP – Metaloproteinases

NCR – Região não codificante

NK – Células *Natural killer*

NS2 a NS5 – Regiões não estruturais do vírus da hepatite C

ORF – Fase de leitura aberta (open reading frame)

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDGF – Fator de crescimento plaquetário

RNA – Ácido ribonucléico

RT-nested-PCR – Transcrição reversa e amplificação nested pela reação em cadeia da polimerase

Ta – linfócitos T auxiliares

Tc – linfócitos T citotóxicos

TGF – Fator de crescimento transformador

TIMP – Inibidores de metaloproteinases

Tregs – linfócitos T regulatórios

VHB – Vírus da hepatite B

VHC – Vírus da hepatite C

# 1 Introdução

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é um importante problema de saúde pública mundial. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 3% da população em geral estão infectados pelo VHC, um vírus RNA de fita única.<sup>1</sup> A hepatite C é responsável, em âmbito mundial, por aproximadamente 80% dos casos de hepatite crônica, 40% das cirroses hepática, 70% dos hepatocarcinomas e 30% dos transplantes hepáticos. Desde 1990, a incidência de novos casos de hepatite C reduziu drasticamente devido ao efetivo controle sorológico realizado nos bancos de sangue. Uma das principais características do VHC é a capacidade de permanecer no hospedeiro, tornando-se uma infecção crônica que ocorre em 50 a 80% dos casos após a contaminação.<sup>2</sup>

A hepatite crônica C é pouco sintomática e a evolução lenta, porém não uniforme. Um grupo de pacientes, em torno de 20%, atingirá o estágio de cirrose hepática após 10 a 20 anos de infecção. Outros pacientes apresentam progressão muito lenta da fibrose e o estágio da cirrose se dará após 40 a 50 anos. Após o estabelecimento da cirrose, o risco de hepatocarcinoma situa-se em 1 a 5% por ano. Essas diferenças na progressão estão relacionadas com o próprio vírus e com fatores do hospedeiro como idade de contaminação, o sexo, o uso de álcool e a coinfeção com os vírus da hepatite B (VHB) e o da imunodeficiência humana. (HIV).<sup>2,3</sup>

Embora tenha ocorrido a redução da incidência, a lenta progressão da doença faz prever que nos próximos anos haverá um aumento no diagnóstico de pacientes com infecção crônica. Além disso, o tratamento ainda apresenta uma série de problemas. O melhor esquema terapêutico atualmente disponível, que é a associação de interferon peguilado e ribavirina, só consegue erradicar o vírus em 50% dos casos e não pode ser utilizado nas formas avançadas da doença, além de produzir uma série grande de efeitos colaterais.<sup>3,4</sup>

Pacientes portadores de insuficiência renal crônica (IRC), especialmente aqueles em tratamento de hemodiálise (HD), apresentam elevada taxa de prevalência de hepatite C. Doença hepática secundária à infecção crônica pelo VHC é importante causa de morbidade e mortalidade nos pacientes em diálise e após o transplante renal.<sup>5</sup> No entanto, a história natural da hepatite C nos pacientes em diálise permanece desconhecida devido a natureza

silenciosa da doença viral e da alta taxa de morbidade e mortalidade dos pacientes urêmicos.<sup>6</sup> O reconhecimento dos fatores de progressão da doença hepática e o tratamento adequado desses pacientes durante o período de hemodiálise acarretará redução das complicações após o transplante renal.

## 1.1 Interação Vírus - Hospedeiro

O vírus da hepatite C (VHC) foi descoberto em 1989 e identificado como um vírus RNA de fita única da família Flaviviridae. O genoma do VHC consiste de aproximadamente 10.000 nucleotídeos e codifica uma única poliproteína de 3000 aminoácidos que é processada por proteases virais e das células hospedeira, gerando três proteínas estruturais, seis proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) e outra proteína com função ainda não conhecida chamada de p7. As proteínas não estruturais são necessárias para a replicação viral. As proteínas estruturais são o core, que é o maior componente do núcleo capsídeo viral, e duas glicoproteínas do envelope (E1 e E2) que, semelhante a outros vírus dessa família, como o vírus da dengue, possui uma conformação que permite a ligação com a membrana celular e são essenciais para a entrada na célula hospedeira.<sup>7</sup> (Figura 1).

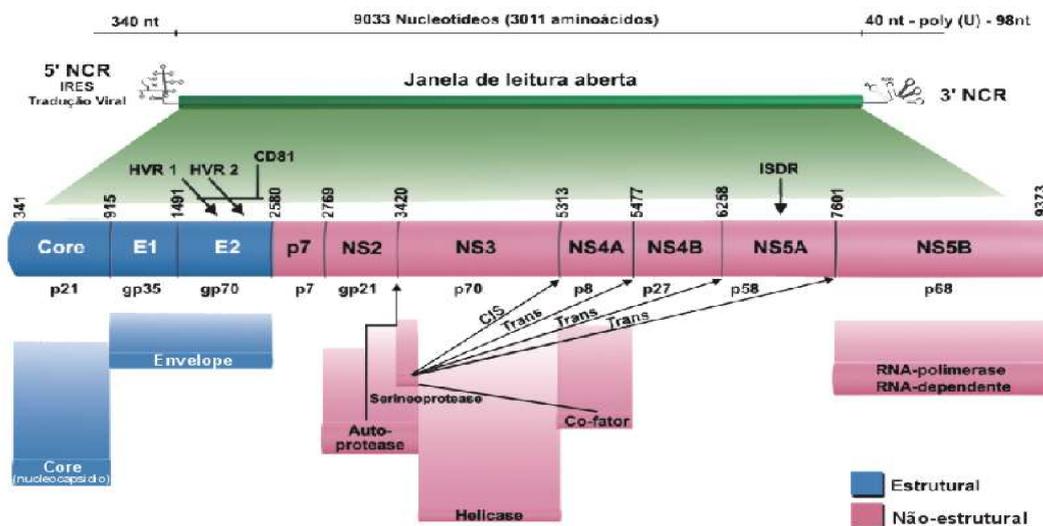


Figura 1: Estrutura do vírus da hepatite C

O VHC apresenta enorme heterogeneidade na seqüência de nucleotídeos nas diversas regiões do genoma viral. As regiões NS5 e core são as mais conservadas. A região 5'

apresenta homologia de aproximadamente 98% na seqüência de nucleotídeos. Na região core observa-se 91% de homologia genômica. De modo similar aos outros vírus RNA, o VHC apresenta importante grau de heterogeneidade genética, decorrente da alta taxa de mutações, estimada entre  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  substituições de bases por sítio ao ano. A heterogeneidade na seqüência de nucleotídeos apresenta diferentes graus, nas diversas regiões do genoma viral. As regiões E1 e E2 são as mais variáveis, com homologia na região E1 de 55% a 75% e na E2 de 65% a 72%. A região E2 apresenta dois segmentos hipervariáveis, HVR1 e HVR2, onde se observa alta taxa de mutações e apresenta papel fundamental na habilidade de o vírus escapar do sistema imune.<sup>8</sup>

Diante de tal diversidade, foi proposta uma classificação do vírus da hepatite C baseada na análise filogenética da região NS5, sendo catalogados seis genótipos e diversos subtipos. A similaridade na seqüência de nucleotídeos varia entre os vírus do mesmo genótipo de 88% a 100% (média de 95%); entre os diferentes subtipos do mesmo genótipo de 70% a 85% (média de 80%); e entre os diferentes genótipos de 55% a 70% (média de 65%). Esses dados foram obtidos avaliando as seqüências de nucleotídeos de regiões relativamente bem conservadas, como E1, NS4 ou NS5.<sup>9</sup>

Os genótipos 1, 2 e 3 apresentam distribuição universal, enquanto o 4 e o 5 são encontrados especialmente na África, e o 6 na Ásia. De modo geral, o mais freqüente é o genótipo 1. Em relação aos subtipos, na Europa e no Japão, observa-se maior prevalência do 1b, enquanto, nos Estados Unidos, os subtipos 1a e 1b são encontrados na mesma proporção.<sup>8</sup> No Brasil, os estudos demonstram a existência dos genótipos 1, 2 e 3, com maior prevalência do subtipo 1b nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste, e do 3a na região Sul.<sup>10</sup> Além das variabilidades genéticas dos genótipos e dos subtipos, o genoma do VHC apresenta diversidade na seqüência de nucleotídeos entre as amostras coletadas de um mesmo indivíduo cronicamente infectado pelo VHC, fenômeno designado quasispécie. Isso significa que, em um mesmo hospedeiro, coexistem várias populações diferentes do mesmo tipo/subtipo viral.<sup>8</sup>

A variabilidade genética descrita (genótipos, subtipos e quasispécies) é suficiente para alterar as propriedades antigênicas e biológicas do vírus. As maiores implicações clínicas da heterogeneidade viral são: a possibilidade de reinfeção com subtipos diferentes e a habilidade do vírus em sobreviver à ação do sistema imunológico do hospedeiro, o que

favorece as altas taxas de cronicidade da infecção.<sup>2,3</sup>

Apesar da descoberta do VHC e do seqüenciamento completo do genoma viral, a não existência de um modelo animal não primata dificulta a pesquisa e o conhecimento de todo o ciclo de vida viral e as interações com o hospedeiro. Hepatócitos derivados de humanos, de primatas e de um tipo de roedor (rato-musgo) podem ser infectados com o VHC derivado de soro.<sup>11,12</sup> No entanto, as limitações desse sistema são o baixo nível de replicação viral, a variável qualidade de hepatócitos humanos obtidas durante ato cirúrgico e a falta de um inóculo viral bem definido.

Modelos alternativos foram desenvolvidos para estudar o ciclo viral como o processo de adesão celular, de entrada, replicação, montagem e liberação do vírus da célula hospedeira, sendo o mais recente um sistema de cultura celular que produz vírions de VHC a partir de genoma viral clonado.<sup>13,14</sup> O mecanismo de entrada do vírus na célula não é completamente conhecido. No entanto, as glicoproteínas do envelope viral, E1 e E2, são componentes essenciais para a entrada na célula do hospedeiro. Anticorpos contra a epítopos da proteína E2, que são determinantes antigênicos que se ligam aos receptores celulares, inibem a união de partículas virais à membrana celular,<sup>15</sup> a entrada de pseudopartículas virais<sup>16</sup> e a infecção do vírus em cultura de células.<sup>17</sup>

Vários receptores celulares foram propostos como mediadores da adesão e da entrada do vírus na célula. O mais estudado é o receptor CD81, uma proteína da família das tetraspaninas, expressa na maioria das células mamíferas e com uma série de funções como adesão celular, mobilidade, ativação celular e transdução de sinais.<sup>18</sup> Anticorpos anti-CD81 inibem a entrada de partículas virais em hepatócitos.<sup>19</sup> Entretanto, o CD81 se liga à fração E2 viral em célula refratária a infecção pelo VHC, sugerindo que esse não é o único ou o específico receptor para o vírus.<sup>20</sup>

O receptor da classe B tipo 1 (SR-B1, *scavenger receptor*), altamente expresso no fígado, que se une à lipoproteína de alta (HDL) e baixa (LDL) densidades, também foi proposto como receptor celular do VHC devido à afinidade com as proteínas da fração E2 do VHC.<sup>21</sup> A adição de anticorpos anti-SR-B1 inibe parcialmente a união de partículas virais na célula hepática.<sup>11</sup> Além disso, o HDL colesterol aumenta a entrada de partículas virais na célula e

esse aumento depende da expressão celular de SR-B1, sugerindo um complexo entre SR-B1, HDL e glicoproteínas do envelope viral.<sup>22</sup>

No entanto, outras células humanas que também expressam os receptores CD81 e SR-B1 não são suscetíveis à infecção pelo VHC, sugerindo que moléculas de superfície específicas do fígado são necessárias para a entrada do vírus na célula.<sup>21</sup> A proteína viral E2 se une especificamente ao sulfato de heparan que é um mucopolissacarídeo característico de célula hepática e pode contribuir para iniciar a infecção e o tropismo celular pelo VHC.<sup>23</sup>

Outras duas moléculas, chamadas de DC-SIGN, que são expressas em células de Kupffer e L-SIGN presente nas células do sinusóide, também apresentam a capacidade de se ligar, capturar e transmitir partículas virais.<sup>24</sup> A captura do VHC por essas células pode facilitar a infecção viral nos hepatócitos e contribuir para a patogênese.

Evans *et al.*<sup>25</sup> descreveram outro componente importante na entrada do vírus na célula: a proteína chamada de Claudin-1, que têm a função de prevenir o transporte paracelular de solutos e manter a polaridade celular. A presença de anticorpos anti-Claudin-1 bloqueiam a infecção pelo VHC e parece que a inibição ocorre numa fase tardia, após a interação da proteína viral com a molécula CD81.

De forma geral, glicoproteínas do envelope viral participam de uma cascata complexa de interações com receptores celulares resultando na entrada do vírus na célula. A união do vírus com proteínas dos hepatócitos desencadeia o processo de endocitose, permitindo a entrada da partícula viral. Após essa fase, ocorre o transporte do vírus para o endossomo, que sofre um processo de acidificação, facilitando a fusão da membrana e penetração do vírus no citoplasma.<sup>26</sup>

O CD81 é expresso na maioria das células humanas e a união dessa molécula com a proteína E2 do VHC induz diferentes alterações funcionais, dependendo da célula envolvida. Por exemplo, a união E2/CD81 estimula a proliferação de linfócitos B não ativados,<sup>27</sup> enquanto que nas células *Natural killer* (NK) ocorre alteração funcional, com bloqueio da liberação de grânulos citoplasmáticos, da produção de IFN- $\gamma$  e da resposta proliferativa à IL2.<sup>28</sup>

Verifica-se também alteração funcional das células dendríticas (CD) que desempe-

nam importantes funções na imunidade inata e adaptativa. Após a lesão celular, CD imaturas capturam os antígenos e migram para o tecido linfóide, onde os apresentam para as células T CD4<sup>+</sup>, que regulam as células efetoras do sistema imune, iniciando a resposta imune.<sup>29</sup> A estimulação direta da molécula CD81 nas células dendríticas rompe o efeito migratório dessas células ao tecido linfóide,<sup>30</sup> mantendo-as no interior do fígado e justificando as alterações em número e funções das mesmas no sangue periférico e no fígado.<sup>31</sup> Além disso, análise de células dendríticas circulantes *ex vivo* demonstrou que o VHC promove uma depleção de CD mielóides e CD plasmocitóide.<sup>32</sup> Em contraste, pessoas com infecção resolvida pelo VHC apresentam essas mesmas células em quantidade semelhante de indivíduos saudáveis.<sup>33</sup>

A união de E2 do VHC com CD81 em linfócito T promove proliferação dessas células e propicia maior atividade co-estimulatória, levando a um aumento na produção de citocinas inflamatórias, sem a necessidade de ativação por receptores de células T.<sup>34</sup>

Nas células estelares (*stellate cells*), a união de E2/CD81 aumenta a secreção de metaloproteinase 2 (MMP2), uma endopeptidase que degrada a matrix extracelular, rompe a membrana basal normal e pode facilitar a penetração de células inflamatórias no sítio de lesão, além de retroativar as células estelares.<sup>35</sup>

Por fim, a ligação do VHC com receptores dos hepatócitos facilita o reconhecimento por anticorpos e essas células podem ser alvos de citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC).<sup>36</sup> A união do anticorpo pode ocorrer com células não infectadas, aumentando a lesão de hepatócitos.

As evidências de ligação de proteínas virais com os hepatócitos e com células de defesa do hospedeiro são muitas, complexas e ocasionalmente resultam em efeitos antagônicos, dificultando a compreensão da rede de interações do VHC com o hospedeiro. Entretanto, é possível afirmar que essa interação rompe ou altera as vias antivirais diretas, amplifica e expande a resposta imune ao ativar mecanismos citolíticos e inflamatórios não específicos e cria um meio ambiente hepático que facilita a ativação das células estelares e a fibrogênese.

## 1.2 Resposta Imune

A resposta imune é importante em todos os estágios da infecção pelo VHC. Na fase aguda da infecção, a resposta imune celular é fundamental para o controle da replicação viral naqueles que conseguem apresentar uma doença limitada. No entanto, ainda não sabemos exatamente os mecanismos de cronificação. Na fase crônica, a resposta imune potencialmente determina a taxa de progressão da doença ao limitar a replicação viral e por outro lado contribui com a imunopatogenia. Além disso, a resposta imune se correlaciona com o sucesso ou a falha do tratamento. Dessa forma, analisar os vários componentes da resposta imune torna-se necessário.

### 1.2.1 Imunidade Humoral

Anticorpos contra o VHC estão presentes em torno da sétima ou oitava semana de infecção. No entanto, o papel dos anticorpos é controverso por causa da incapacidade de prevenir reinfeção.<sup>37</sup> Além disso, em alguns casos, a infecção pelo VHC pode ser eliminada sem o desenvolvimento de anti-HCV específicos.<sup>38</sup> Alterações na seqüência do genoma na região hipervariável do segmento E2 foram descritas em humanos com infecção aguda e essas mudanças correlacionaram-se com a evolução da infecção.<sup>39</sup> Essas alterações foram concomitantes à soroconversão e interpretadas como mutações virais de escape à pressão imune. No entanto, pré-tratamento com anticorpos dirigidos contra a fração E2 preveniu a infecção do VHC em chimpanzés.<sup>40</sup> Além disso, anticorpos neutralizantes têm sido demonstrados no soro de pacientes infectados pelo VHC, embora esse achado seja pouco freqüente em pacientes com infecção resolvida.<sup>41</sup> Assim, a precisa contribuição da resposta humoral na lesão hepática e na progressão de fibrose permanece não determinada.

### 1.2.2 Imunidade Celular

#### Fase Aguda

A fase inicial da resposta contra infecções virais ocorre de forma inespecífica. Essa resposta é mediada por proteínas séricas e receptores de superfície, capazes de interagir de

forma imediata aos agentes invasores. As infecções virais agudas são debeladas pela ação do interferon tipo I (INF-I) ou das células NK (*Natural killer*), que são secretadas pela ativação celular. O INF-I induz a síntese de diversas proteínas com propriedades antivirais, como a PKR (Proteína Kinase), a 2',5'-oligoadenilato sintetase (2-5OAS) e a proteína Mx (*myxovirus resistance proteins*). O INF se liga ao receptor de INF (IFNR) na superfície da célula parasitada e ativa a Janus kinase (JAK), que induz a fosforilação das proteínas do citoplasma chamadas STATs, 1 e 2 (*Signal Transducer of Activated Transcription*). As STATs formam um dímero que se dirige ao núcleo da célula onde forma um complexo com a proteína p48, chamado fator de estimulação de genes ISGF3 (INF Stimulated Gene Factor 3). Esse complexo se liga ao IRES (*internal ribosome entry site*), que é um promotor de RNA, com produção de RNAm e estímulo dos genes responsáveis pela produção das proteínas responsáveis pela resposta antiviral.<sup>42</sup>

A presença de alterações na transcrição de genes produtores de interferon foi observada na primeira semana de infecção em chimpanzés infectados, indicando a presença dessa substância que é essencial na defesa contra infecção viral.<sup>43</sup> No entanto, a produção de IFN tipo 1 (alfa e beta) não se correlacionou com a evolução da infecção aguda, indicando que o VHC poderia não ser sensível aos efeitos antivirais do interferon.<sup>44</sup> Diante disso, surgiram algumas possíveis explicações: 1 - a proteína NS3-NS4 do VHC bloqueia a produção ou a ação do interferon;<sup>45</sup> 2 - proteínas virais inibem a proteína PKR, enzima indutora de IFN;<sup>46</sup> 3 - fragmentos do VHC interagem com receptores celulares e inibem a função de células NK, diminuindo a apresentação de antígenos virais, alterando a liberação de quimiocinas e a mobilização das células dendríticas e de linfócitos T. Dessa forma, observa-se uma redução da reação imune inata.<sup>28,31,34</sup>

Apesar da intensa replicação do VHC, células T específicas surgem tardiamente, entre a quinta e a nona semana de infecção, por motivos não conhecidos.<sup>44</sup> Três possíveis tipos de resposta celular são observados. Os pacientes com infecção limitada apresentam uma intensa, específica e duradoura resposta de linfócitos T CD8 e CD4. O segundo tipo de resposta surge numa parcela dos pacientes que evoluem para hepatite crônica. Inicialmente, surge uma resposta celular específica contra o VHC, com aparente controle sobre a infecção. No entanto, em seguida, a resposta T inicial reduz para níveis praticamente indetectáveis,

permitindo o retorno da viremia. Dessa forma, o controle da infecção se perde e a infecção crônica. O terceiro tipo de resposta também ocorre nos pacientes que evoluem para a forma crônica. Observa-se uma fraca resposta ou mesmo ausência dos linfócitos T CD4 e CD8 desde o início da infecção.<sup>47</sup>

### Fase Crônica

O papel exato das células T específicas contra o VHC na infecção crônica não é claro, mas essas células mostram anormalidades fenotípicas e funcionais. Células T CD8 específicas contra o VHC predominantemente expressam o fenótipo CCR7<sup>high</sup>/perforina<sup>low</sup>, falham ao secretar IFN- $\gamma$  e apresentam menor atividade citotóxica *ex vivo*.<sup>48</sup> Células TCD4 específicas apresentam reduzida capacidade de proliferação e menor produção de citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF $\beta$ .<sup>49</sup> Essas anormalidades das células T são potencialmente reversíveis, desde que a adição de IL-2 ou a estimulação via receptor de células T (TLR2) podem restaurar a capacidade proliferativa dessas células.<sup>50,51</sup> Além disso, o uso de interferon restaura a resposta antiviral TH1 propiciando a eliminação do VHC.<sup>52</sup>

Os mecanismos que desregulam e diminuem a resposta celular específica contra o VHC são os aspectos fundamentais na imunopatogênese dessa infecção. As possíveis causas de disfunção imunocelular crônica são: escape imune devido às mutações virais, ação reduzida de células TH, exaustão das células T e presença de células T regulatórias exercendo efeitos inibitórios.<sup>53</sup>

A replicação do VHC ocorre por uma RNA polimerase, RNA dependente, propiciando uma enorme quantidade de variantes virais menores que podem escapar do reconhecimento do sistema imunológico.<sup>54</sup> Mutações do VHC, levando ao escape imune de células T CD8, foram identificadas somente recentemente em estudos longitudinais, após infecção aguda e em surto da doença.<sup>55</sup> Mutações e escape viral a partir da resposta TCD4 ainda não foram identificados.

Reduzida resposta citotóxica pode ser decorrente da perda espontânea de células TCD4.<sup>56</sup> Entretanto, não são conhecidos os mecanismos da perda de função dessas células, porque a grande maioria delas não é eliminada e a funcionalidade pode ser restaurada *in vitro*.<sup>57</sup>

Exaustão de células T, seja por anergia ou deleção clonal, é um conceito alternativo para explicar resposta T alterada na hepatite crônica C, que surgiu após experimentos com modelo murino de coriomeningite linfocítica. Nesse modelo, a viremia persistente é acompanhada por resposta celular T, mas falha ao eliminar o vírus. Em seguida, a resposta celular apresenta um gradual declínio e, depois, ocorre completa deleção de TCD4 e TCD8.<sup>58</sup> Na hepatite crônica causada pelo VHC, a deleção completa de células TCD8<sup>+</sup> específicas não ocorre, porque elas podem ser restauradas *in vitro*.<sup>59</sup>

As células T regulatórias (Tregs) controlam a indução e a efetividade de outras células do sistema imune, secretando citocinas imunossupressoras, como a IL-10 e TGFβ. Essas células estão presentes no fígado de pacientes com hepatite crônica e suprimem *in vitro* a proliferação das células T específicas contra o VHC.<sup>60</sup> Além disso, o número de células Tregs CD4<sup>+</sup> estavam aumentados no sangue periférico de pacientes com hepatite crônica, comparada a pacientes que eliminaram a infecção e a controles saudáveis.<sup>61</sup>

Independente do mecanismo, é possível que a persistência do VHC seja propiciada por inúmeros efeitos virais que interferem com a imunidade inata e pode resultar em deficiente ação da célula T CD4. Dependendo da severidade da disfunção dessas células, as células TCD8<sup>+</sup> triunfam ou falham no controle da VHC. No caso da hepatite crônica C, células TCD8<sup>+</sup> persistem no fígado e muito provavelmente contribuem para a lesão hepática.

### 1.2.3 Fibrose Hepática

Fibrose hepática é definida como um excessivo e anormal acúmulo de matrix extracelular no fígado e a substituição das fibras de baixa densidade de colágeno tipo IV pelas fibras de colágeno tipo I e III no espaço de Disse.<sup>43</sup> O estágio mais avançado é a cirrose hepática que se caracteriza por nódulos regenerativos do parênquima hepático separados por septos fibrosos. A fibrose surge em decorrência da necrose ou apoptose de hepatócitos, da infiltração de células inflamatórias e das alterações da matrix extracelular.<sup>62</sup> Estudos com animais e humanos demonstram a relação entre atividade inflamatória e fibrose hepática.<sup>63</sup> Os componentes da resposta inflamatória liberam citocinas e quimiocinas que ativam os miofibroblastos que farão o depósito das fibras na matrix extracelular. A presença dessas fibras

no espaço de Disse gera conseqüências aos hepatócitos, provocando perda das vilosidades, e aos vasos, promovendo perda das fenestrações dos sinusóides. Isso altera a arquitetura e promove perda funcional do fígado.

Os componentes do sistema inflamatório influenciam no desenvolvimento de fibrose em modelos experimentais. Como exemplo, Radaeva *et al.*<sup>64</sup> avaliaram o papel das células NK que, ativadas, induziam a morte de miofibroblastos e atenuavam a severidade da fibrose hepática. O efeito protetor foi diminuído quando havia depleção das células NK ou por disfunção do gene de IFN- $\gamma$ . Também se constatou a existência de subpopulações funcionalmente distintas de macrófagos no mesmo tecido que apresentam funções importantes na fase de injúria e na fase de recuperação do processo de cicatrização.<sup>65</sup>

Como citado acima, a fibrose é decorrente do acúmulo e proliferação de miofibroblastos que se formam a partir das células estelares e células mesenquimais do fígado.<sup>66,67</sup> Miofibroblastos derivados da medula óssea podem deslocar-se para o interior do fígado e contribuir para a fibrogênese.<sup>68</sup> Os miofibroblastos expressam alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), um filamento contrátil que, no fígado, é marcador de célula fibrogênica e pode prever a progressão de fibrose.<sup>69</sup> A mais importante célula fibrogênica no fígado é a célula estelar, que se localiza no espaço perisinusoidal e em condições normais estão quiescentes e ricas em vitamina A. Quando ativadas, transformam-se e adquirem várias funções como proliferação, fibrogênese, contratilidade e quimiotaxia. Além disso, atuam como células apresentadoras de antígeno, estimulam a proliferação de linfócitos e ativam a resposta das células T.<sup>70-72</sup>

A ação das células estelares é balanceada por uma série de citocinas, algumas fibrogênicas e proliferativas e outras com ação antifibrose. Dentre as do primeiro grupo, destaca-se o fator de crescimento transformador (TGF- $\beta$ 1), que é a mais potente citocina profibrótica, produzido por plaquetas, linfócitos T, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos. Atua induzindo a apoptose e inibe a regeneração dos hepatócitos. Além disso, promove a expressão de colágeno, a transição das células estelares em miofibroblastos e a inibição da degradação da matrix extracelular por meio da expressão dos inibidores de metaloproteinases (TIMPs).<sup>70,73</sup>

O fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) que estimula a síntese de colágeno e de fibronectina pode mediar alguns dos efeitos do TGF- $\beta$ 1.<sup>74</sup> O fator de crescimento plaquetário (PDGF) contribui para a fibrose, e a isoforma B (PDGF-B) é o fator estimulante mais potente das células estelares.<sup>75</sup> A angiotensina II, que é expressa no fígado lesado e está envolvida na gênese da hipertensão portal, também contribui para a fibrose hepática.<sup>70,73</sup>

As citocinas com propriedade antifibrose são: o fator de crescimento hepatocitário,<sup>76</sup> interferon- $\gamma$ ,<sup>77</sup> interleucina-10<sup>78</sup> e adiponectina.<sup>79</sup> As ações dessas citocinas são por efeitos diretos sobre as células estelares ou por suprimir a ação das citocinas profibrose.

A rede de fibras de colágeno depositada pelos fibroblastos é regulada continuamente num balanço entre a síntese e o catabolismo do colágeno. Esse controle é feito por uma família de enzimas proteolíticas chamadas de metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) que são produzidos por granulócitos, macrófagos, células epidermais e miofibroblastos.<sup>80</sup> As MMPs são moléculas importantes na reparação e remodelamento dos tecidos. As TIMPs inibem as enzimas proteolíticas e promovem a sobrevivência das células fibrogênicas ao induzir a proteína Bcl-2 que possui ação anti-apoptose. Quando a fibrogênese prevalece sobre a fibrinólise ocorre a deposição de matrix extracelular e aparece a fibrose. Assim, as células estelares permanentemente ativas produzem um microambiente que favorece a fibrose hepática por meio de uma combinação de maior produção de matrix extracelular, redução da ativação das MMPs e inibição das MMPs.<sup>81</sup>

Foi comprovada reversão da fibrose hepática em portadores dos vírus da hepatite B e C, de hepatite auto-imune e doença de Wilson que foram submetidos a tratamento específico e em modelos animais quando foi retirado o agente hepatotóxico.<sup>62</sup> Nesses estudos, os fatores determinantes para a reversão da fibrose foram a eliminação do agente agressor e a apoptose das células estelares. Outro aspecto importante foi a composição da matrix extracelular, pois certas fibras de colágeno são mais difíceis de romper. No entanto, embora a reversão da fibrose tenha sido documentada, ainda não é possível afirmar que a alteração da arquitetura e vasculares observadas na cirrose em humanos pode ser completamente eliminada.<sup>63</sup>

Na infecção pelo VHC, o processo inflamatório crônico é o maior estímulo para a fibrose. No entanto, o vírus pode diretamente interferir e apressar o processo de fibrose

hepática devido à interação de proteínas virais com o sinusóide e com as células estelares.<sup>82</sup> Além disso, as proteínas virais apresentam efeitos sobre crescimento celular, indução de apoptose, além de promover stress oxidativo e imunomodulação.<sup>83</sup>

Diante do importante efeito do sistema imune na evolução da infecção do VHC, os efeitos do polimorfismo genético têm sido avaliados em relação à progressão da doença, eliminação viral e resposta terapêutica. Com a técnica de estudo de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) foram identificados vários genes com influência na taxa de progressão da doença hepática causada pelo VHC.<sup>84-88</sup>

## 1.3 Formas Clínicas do Vírus da Hepatite C

### 1.3.1 Hepatite Aguda

Nos países desenvolvidos, a incidência de hepatite aguda pelo VHC reduziu drasticamente devido ao rígido controle nos bancos de sangue. No entanto, hepatite C aguda ainda ocorre nesses países, sendo o uso de drogas injetáveis o fator de risco mais importante.<sup>89</sup> Outros fatores de risco são: procedimentos cirúrgicos, atividade sexual promíscua, transmissão vertical, nosocomial e profissionais na área de saúde.<sup>90</sup> Nos países pobres, a infecção aguda ainda é importante, especialmente nos países africanos, onde a prevalência de hepatite C é elevada, associada ao não controle dos produtos de sangue, ao reuso de seringas e a fatores socioculturais, como a realização de circuncisão.<sup>91</sup>

A hepatite C aguda é usualmente assintomática. Os sintomas estão presentes em 20% a 30% dos pacientes, surgindo em torno da sétima semana após a infecção. A icterícia ocorre em 20 a 30% e os sintomas mais comuns são inespecíficos. A hepatite aguda pode ser prolongada, mas raramente apresenta forma fulminante. O RNA do VHC pode ser detectado no sangue 3 a 7 dias após a exposição. Habitualmente, a elevação da enzima alanina aminotransferase (ALT), associado à história de exposição ao VHC, no período de 2 a 12 semanas antes da alteração laboratorial, acompanhado da detecção do RNA do VHC no sangue permite o diagnóstico da infecção aguda.<sup>90,91</sup>

Numa revisão sistemática de hepatite C aguda, a resolução espontânea da infecção

variou de 0 a 80% com média de 26% (IC95% - 22% a 29%). Os fatores relacionados com a eliminação do vírus que ocorre nos primeiros 3-4 meses de infecção foram: sexo feminino, pacientes sintomáticos, intensa resposta imunológica adaptativa e fatores virais como carga viral, genótipo e a presença de quasiespécies.<sup>92</sup>

### 1.3.2 Hepatite Crônica

A maioria é assintomática ou apresenta sintomas leves como fadiga, incômodo em hipocôndrio direito e inapetência. ALT normal ocorre em 30% dos infectados e habitualmente a doença não é progressiva nesse grupo. Quando presente, a elevação da ALT pode ser contínua ou intermitente, não existindo correlação com a lesão histológica. A fase crônica evolui por algumas décadas, podendo o paciente vir a falecer por outra causa. No entanto, numa parcela dos pacientes cronicamente infectados, a fibrose é progressiva e o paciente desenvolve cirrose hepática sem manifestação clínica importante.<sup>2</sup>

No entanto, a história natural da hepatite C ainda não está completamente conhecida. Estudos com longo prazo de acompanhamento mostraram que embora a doença hepática tenha sido mais prevalente nos pacientes infectados pelo VHC, a taxa de mortalidade foi semelhante.<sup>93,94</sup> Além disso, a taxa de pacientes que evolui para cirrose apresentou variação muito grande, dependendo do local de estudo (centros de referência ou comunitários), do tipo de estudo (retrospectivo ou prospectivo) e de certos fatores como a elevação de ALT e o uso de álcool.<sup>95</sup> De forma geral, 15 a 20% dos pacientes com infecção crônica pelo VHC evoluem para cirrose hepática.

Estudo avaliando a progressão da fibrose hepática detectou que ela ocorre em 30% dos pacientes, numa taxa de 0,133 unidades de fibrose por ano, variando de 0,125 a 0,143.<sup>96</sup> O tempo médio estimado para atingir o estágio de cirrose foi de 30 anos, podendo variar de 20 a 50, dependendo da idade de aquisição da doença, do sexo, do uso de álcool, do estágio inicial de fibrose e grau de imunodepressão. A fibrose não evolui com velocidade constante, sendo acelerada nas fases mais avançadas da doença. Por fim, na fase compensada de cirrose, a taxa de sobrevivência é em torno de 80% em 10 anos, enquanto que na fase descompensada, quando o doente apresenta ascite, encefalopatia, sangramento e icterícia, essa taxa situa-se em torno

de 50% em 05 anos. A taxa de descompensação nos pacientes com cirrose compensada é de 4 a 5% ao ano.<sup>90</sup>

## 1.4 Hepatite C e Insuficiência Renal Crônica

### 1.4.1 Formas de transmissão

Transfusão de sangue foi o fator de risco mais importante para a transmissão do VHC em hemodiálise, até que os bancos de sangue, no início da década de 90, passaram a utilizar, rotineiramente, testes sorológicos de pesquisa de anti-HCV.<sup>97</sup> No entanto, a constatação de maior taxa de soro conversão nas unidades de hemodiálise com maior prevalência de VHC e o diagnóstico de hepatite aguda C em pacientes que não receberam transfusão, acrescida do estudo de seqüenciamento genético mostrando importante homogeneidade viral nos pacientes da mesma unidade, confirmaram a transmissão nosocomial do vírus.<sup>98-101</sup> Os fatores de risco são: proximidade física com os pacientes contaminados; ausência de desinfecção de máquinas, dos instrumentos e das superfícies ambientais na troca dos turnos de tratamento; uso coletivo de medicamentos; ausência de luvas e de lavagem das mãos na manipulação de pacientes.<sup>102</sup>

### 1.4.2 Epidemiologia e diagnóstico

A taxa de prevalência de hepatite C em unidades de hemodiálise apresenta grande variação; sendo, por exemplo, de 3% na Holanda, 22,5% na Itália e 80% no Egito. A prevalência comumente é maior em países pobres, mas mesmo nos desenvolvidos é bastante superior à observada na população em geral.<sup>6</sup> No Brasil, a taxa de prevalência situa-se entre 8,4% a 64,7%, dependendo do local, da época do estudo e da metodologia utilizada.<sup>103-117</sup>

A incidência de hepatite C nas unidades de hemodiálise está diminuindo em muitos países devido à maior aderência às medidas preventivas. Na Bélgica, por exemplo, a incidência, em 1992, era 1,4% e reduziu a zero em 1995.<sup>118</sup> No entanto, esse fenômeno não é universal, e mesmo nos países desenvolvidos a incidência de hepatite aguda C em unidades de hemodiálise permanece constante, diferente da população em geral onde houve uma

queda acentuada de novos casos de hepatite C.<sup>93</sup>

O diagnóstico de infecção aguda causada pelo VHC é difícil. O período de janela imunológica é longo. A presença de anticorpos anti-HCV é detectado em torno do terceiro mês após a infecção, podendo às vezes surgir somente após o quinto mês.<sup>119</sup> Ademais, pacientes urêmicos apresentam níveis de ALT mais baixos que os pacientes com função renal normal.<sup>120</sup> Na hepatite aguda pelo vírus C, nos renais crônicos, a elevação da aminotransferase é discreta, muitas vezes não ultrapassando o nível superior da normalidade.

A utilização dos testes ELISA de primeira e segunda geração (ELISA 1 e 2), como rastreamento de hepatite C, nos pacientes em hemodiálise, ocasionou percentual elevado de resultados falso negativo (exame sorológico negativo e pesquisa do RNA viral positiva).<sup>121</sup> Com os testes ELISA de terceira geração houve uma melhora na sensibilidade e especificidade desse método.<sup>122</sup> Com esse teste, o exame falso negativo é muito raro, sendo considerado método de escolha para rastreamento nos pacientes em HD.<sup>123</sup>

A taxa de cronificação do VHC em HD é semelhante a dos pacientes com função renal normal e situa-se entre 65% a 87%.<sup>92,119,124</sup> A carga viral do VHC nos pacientes em hemodiálise é, em geral, mais baixa quando comparada aos pacientes com função renal normal, embora não demonstrada em todos os estudos.<sup>125-128</sup> Observa-se, ainda, redução da viremia durante a sessão de filtração do sangue, mas a razão não está devidamente esclarecida. A distribuição do genótipo do VHC no grupo de pacientes em HD parece ser a mesma da população em geral.<sup>108,128-131</sup>

### 1.4.3 Evolução Clínica

A dificuldade de conhecer a história natural da hepatite C nos pacientes em hemodiálise é ainda maior porque, além do caráter silencioso da doença hepática, os pacientes em hemodiálise apresentam sobrevida reduzida. Sugerem-se duas maneiras de avaliar a história natural da hepatite C nos pacientes portadores de IRC em HD: por meio da avaliação da taxa de mortalidade e das alterações histológicas que ocorrem na infecção crônica.

Os pacientes portadores do VHC em hemodiálise apresentam risco de mortalidade maior que os pacientes não infectados.<sup>32,132-134</sup> Além disso, pacientes com anti-HCV positivo

em terapia dialítica apresentavam maior taxa de mortalidade quando comparado àqueles submetidos a transplante renal.<sup>132,135,136</sup>

Após o transplante, o impacto da hepatite C é controverso, mas uma metanálise com oito estudos retrospectivos detectou um maior risco de perda do enxerto e de mortalidade entre os pacientes portadores do VHC, sendo esses riscos estimados em 1,79 (IC95% 1,57-2,03) e 1,56 (IC95%, 1,35-1,80), respectivamente.<sup>137</sup> Além disso, foi demonstrado, em 1993, que os pacientes com hepatite crônica ativa e importante fibrose hepática antes da realização do transplante renal apresentavam pior evolução após o procedimento.<sup>138</sup>

Desde então, vários estudos relatando as alterações histológicas nos pacientes em hemodiálise foram publicados.<sup>22,139-147</sup> O percentual de pacientes com cirrose hepática variou de 0% a 24%, e de fibrose em ponte, de 3 a 11%. O grau de atividade inflamatória foi em geral discreto e não houve correlação com níveis de ALT. No entanto, existe relato de evolução para cirrose hepática em período inferior a 10 anos após o episódio de hepatite aguda causada pelo VHC.<sup>140</sup> Além disso, poucos estudos correlacionaram dados histológicos hepáticos com carga viral e genótipo<sup>143,145,146</sup> ou compararam os achados histológicos com pacientes infectados e função renal normal.<sup>22,143,145</sup>

Em suma, podemos afirmar que: 1) a população de portadores de insuficiência renal é crescente, o risco de transmissão nosocomial dentro das unidades de hemodiálise é sempre presente e a taxa de prevalência de hepatite C nessa população é elevada; 2) a taxa de mortalidade nos pacientes com anti-HCV positivo em hemodiálise é maior, se comparados aos pacientes com sorologia negativa, sendo a doença hepática e hepatocarcinoma causas de óbito mais freqüentes; 3) após o transplante renal, pacientes com anti-HCV positivo apresentam maiores risco de óbito e de perda do enxerto, comparados àqueles não infectados; 4) os pacientes submetidos a transplante renal com doença hepática avançada ou grau de atividade inflamatória importante apresentam pior evolução; 5) os dados de biópsia hepática dos pacientes com o VHC em HD parecem ser aparentemente contraditórios, pois em geral as alterações são discretas e a doença hepática é menos ativa, mas existe relato de evolução para cirrose com menos de 10 anos; 6) existem escassos dados comparando pacientes infectados com o VHC em hemodiálise com pacientes com função renal normal; 7) existem poucos estudos correlacionando aspectos histológicos da doença hepática com fatores virais, como

carga viral e genótipo nesse grupo de pacientes. Dessa forma, novos estudos avaliando a interação do VHC nos pacientes em hemodiálise são necessários para conhecer essa doença e propiciar melhores condições de vida a esse grupo de pacientes.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

- Comparar os aspectos laboratoriais, virológicos e histológicos dos pacientes portadores de IRC em hemodiálise com um grupo de pacientes portadores do VHC e função renal normal emparelhados em relação à idade, sexo e tempo de infecção.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Correlacionar os dados histológicos dos pacientes infectados pelo vírus da hepatite C em hemodiálise com aspectos demográficos, laboratoriais e virológicos.
- Avaliar as características virológicas (carga viral e genótipo) e histológicas dos pacientes infectados pelo vírus da hepatite C e portadores de insuficiência renal crônica em programa regular de hemodiálise no Distrito Federal.
- Avaliar a taxa anual de progressão da fibrose nos pacientes portadores do vírus da hepatite C em hemodiálise que não foram submetidos a transplante renal.
- Identificar a existência de fatores de risco para a ocorrência de fibrose e de atividade inflamatória nos pacientes infectados pelo VHC.

## 3 Pacientes e Métodos

### 3.1 Delineamento do estudo

O delineamento do presente estudo foi dividido em duas etapas:

- Primeira etapa - estudo caso-controle, sendo o grupo de estudo ou grupo I composto por 36 pacientes infectados pelo VHC e portadores de IRC em hemodiálise. O grupo controle ou grupo II foi formado por 37 pacientes infectados pelo VHC e com função renal normal. Os dois grupos foram constituídos por pacientes que apresentavam semelhança nos itens sexo, idade e tempo de infecção. Foram analisados aspectos clínicos, bioquímicos, virológicos e histologia hepática.
- Segunda etapa – estudo prospectivo, com a realização de uma segunda hepática para avaliar a taxa de progressão de fibrose hepática nos pacientes do grupo de estudo (IRC, em hemodiálise) que continuavam em lista de transplante renal.

### 3.2 Pacientes

Foram elegíveis para participar desse estudo os pacientes portadores de insuficiência renal crônica, em avaliação pré-transplante renal, atendidos no ambulatório especializado de fígado da Unidade de Gastroenterologia do Hospital de Base, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2006. O trabalho foi protocolado e aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa da Secretaria de Saúde do Distrito Federal. Após receberem detalhadas informações, os pacientes assinaram o termo de consentimento (Anexo A.1) concordando em participar do estudo que continha os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Critérios de inclusão:

- Programa regular de hemodiálise há mais de 12 meses;
- Presença de anti-HCV (ELISA 3) há mais de 12 meses;
- HCV-RNA positivo (AmplicorR, Versão 2.0, Roche);

- Biópsia hepática com fragmento adequado para análise histológica.

Critérios de exclusão:

- HBsAg positivo;
- Anti-HIV positivo;
- Tratamento prévio de hepatite C com interferon convencional ou peguilado e ribavirina;
- Ingesta alcoólica superior a 20 gramas para as mulheres e 40 gramas para homens;
- Doença hepática descompensada, caracterizada pela presença de ascite, encefalopatia, icterícia ou história de hemorragia digestiva alta por ruptura de varizes de esôfago.

O grupo controle foi formado por pacientes portadores de hepatite crônica causada pelo VHC e com função renal normal (FRN), definida como nível de creatinina dentro do limite da normalidade ( $\leq 1,0$  mg/dl). Esses pacientes estavam cadastrados no banco de dados de hepatite crônica C e atendidos no mesmo ambulatório. Para o emparelhamento foi levado em consideração o sexo, a idade, o tempo estimado da infecção e a provável aquisição do vírus por transfusão de sangue. Foi aceito um período de diferença de 03 anos para o tempo de infecção presumido e a idade de contaminação. Além disso, para formação do grupo controle havia os seguintes critérios de inclusão:

- Anti-HCV e HCV RNA positivos;
- HBsAg negativo;
- Anti-HIV negativo;
- Ausência de tratamento para o VHC prévio;
- Ingesta alcoólica superior a 20 gramas para as mulheres e 40 gramas para homens;
- Biópsia hepática adequada para reavaliação histológica

### 3.3 Método

Os pacientes foram avaliados no ambulatório de gastroenterologia. A avaliação clínica consistiu de anamnese e de exame físico realizado pelo investigador. Os dados de idade, sexo, fatores de risco para a aquisição do vírus da hepatite C, peso, altura e história de diabetes mellitus foram obtidos durante a avaliação clínica e revisão dos prontuários. O diagnóstico de diabetes mellitus foi baseado no relato de uso de hipoglicemiante oral ou insulina e glicemia de jejum maior de 110 mg/dl. O tempo de infecção foi estimado, no grupo de estudo, a partir do início de hemodiálise ou do ano que o paciente recebeu a transfusão de sangue. No grupo controle, o tempo de infecção foi estimado a partir da data de transfusão de sangue. Foi realizada uma detalhada explanação sobre a necessidade de realização de biópsia hepática como avaliação do pré-transplante renal e como seria feito o procedimento. Além disso, foram solicitados exames para verificação de coagulação pré-biópsia e ecografia de abdome superior.

Os exames bioquímicos (glicose, alanina aminotransferase, proteína total, albumina e saturação de transferrina) foram realizados no Laboratório Central do Hospital de Base do DF, enquanto que a atividade de protrombina e o INR foram realizadas no Laboratório do Banco de Sangue do Hospital de Base do DF. A dosagem de alanina aminotransferase foi realizada pelo método cinético automatizado, com valores normais para homem até 35 UI/l e para mulheres até 30 UI/l. O nível considerado de ALT foi uma média de três exames realizados nos 06 meses precedentes à biópsia hepática.

O teste sorológico foi realizado no laboratório da Fundação Hemocentro de Brasília, sendo utilizado o ensaio imunoenzimático de terceira geração para detecção de anticorpos anti-HCV (ELISA-3) que detecta qualitativamente por quimiluminescência os anticorpos contra o VHC (Abbott PrismR). Nos pacientes com sorologia positiva (*cutt-off* maior que 5) foi realizado estudo virológico.

Para a pesquisa de RNA qualitativo, quantitativo e genótipo foi coletado sangue imediatamente antes do início da sessão de hemodiálise e após o maior período inter-diálise, aproveitando o momento da punção venosa para iniciar o tratamento de hemofiltração. Foram coletados 10 ml de sangue mediante o uso de luvas e seringa descartáveis, estéreis

e sem anticoagulantes. Essa amostra de sangue foi transportada, pelo pesquisador, ao Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Hemocentro de Brasília. O transporte do sangue foi realizado em recipiente com temperatura a 4°C.

No laboratório, o sangue foi imediatamente centrifugado, numa rotação de 1200x, durante 20 minutos, em temperatura ambiente, para a separação do soro das células do sangue. O soro foi dividido em quatro frascos de polipropileno esterilizados, de 1,5 ml, com tampas de enroscar, e devidamente identificados como frasco I, II, III e IV. O frasco I foi estocado a -70°C e serviu como soroteca. O frasco II foi utilizado para pesquisa do RNA qualitativa do vírus da hepatite C, pela técnica de *RT-nested-PCR*, na Fundação Hemocentro de Brasília. O frasco III foi encaminhado para o Laboratório Sabin de Brasília para realização do teste HCV RNA quantitativo. O frasco IV foi enviado para o Laboratório de Virologia da Faculdade de Biologia da Universidade de Brasília onde foi realizada a identificação do genótipo do VHC.

Todo o manuseio do material no Hemocentro foi realizado com técnica *RNAse-free*, em capela de fluxo laminar, sendo os soros congelados em até duas horas após a coleta. Esses procedimentos fazem parte da técnica *RNAse-free*, que objetiva eliminar a presença de enzimas naturais que podem degradar o material genético, composto por RNA, presente na amostra.

#### **Teste HCV RNA qualitativo**

A pesquisa de ácidos nucleicos, realizada pelo Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Hemocentro de Brasília, utilizou o teste AmplicorR, Versão 2.0, do Laboratório Roche.

#### *Metodologia do teste*

O teste Amplicor é um exame qualitativo *in vitro* para a detecção do RNA do VHC e baseia-se em cinco processos principais: na preparação da amostra; na transcrição reversa do RNA alvo para produzir DNA complementar (cDNA); na amplificação do cDNA alvo por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR), utilizando iniciadores complementares específicos para o HCV; na hibridização dos produtos amplificados com sondas de oligonucleotídeos específicas para o alvo e na detecção dos produtos amplificados e fixos à sonda ,

por determinação colorimétrica.

A preparação da amostra consiste no isolamento do material genético procurado (RNA viral) que ocorre com a lise de partículas virais, promovida por reagente específico. O teste dispõe de um RNA de controle interno do VHC que é introduzido em todas as amostras analisadas juntamente com o reagente de lise. Esse RNA de controle interno atua como um controle da extração e amplificação para cada amostra processada.

A transcrição reversa e a amplificação por PCR do RNA do VHC e do RNA do controle interno são realizadas de forma simultânea e na mesma mistura de reação por utilizar uma enzima recombinante termo-estável DNA polimerase do *Thermus thermophilus* (rTth pol). Na presença de manganês ( $Mn^{2+}$ ) e em condições de tampão adequadas, essa enzima exibe atividade de transcriptase reversa e de DNA polimerase. O teste utiliza os iniciadores KY78 e KY80 para definir uma seqüência de 244 nucleotídeos dentro da região 5'- não traduzida e altamente conservada no genoma do VHC. A seqüência de nucleotídeos do iniciador KY78 é ctcgcaagca ccctatcagg cagt e a seqüência do iniciador KY80 é gcagaaagcg tctagccatg gcgt. A seqüência de captura da sonda e as seqüências do iniciador encontram-se localizadas nos domínios mais conservados do genoma viral, como a região 5'-não traduzida. O iniciador, a jusante ou antisense (KY78), em temperatura adequada, se liga especificamente ao RNA alvo do HCV. Na presença de deoxinucleotídeos (deoxiadenosina (dATP), deoxiguanosina (dGTP), deoxicitidina (dCTP) e deoxiuridina (dUTP) no lugar de timidina) em grande quantidade, a enzima recombinante rT th pol alonga o iniciador dando origem a uma cadeia de DNA complementar (cDNA) ao RNA viral.

Depois de ocorrer a etapa da transcrição, a mistura foi aquecida para desnaturar o híbrido RNA: cDNA e expor as seqüências alvo. Após a redução da temperatura, o iniciador a montante (KY80) liga-se à cadeia de cDNA e a enzima rT th pol alonga o iniciador, sintetizando uma nova cadeia de DNA. O processo de elevar a temperatura, separar as cadeias complementares, expor as seqüências aos iniciadores e o alongamento da cadeia, ativado pela enzima recombinante, é repetido durante um determinado número de ciclos e produzir uma molécula de 244 pares de bases é denominado de amplificação. Essa amplificação ocorre apenas no lugar do genoma do VHC situado entre os iniciadores, não se amplificando todo o genoma do vírus.

Após a amplificação, a seqüência de RNA viral e do controle interno do teste são desnaturadas quimicamente para formar um DNA de cadeia simples. Pequenas quantidades do material desnaturado são colocadas em contato com sondas específicas para o VHC (KY150) ou para o controle interno do VHC (SK535) em placas de micropoços, onde ocorre a hibridização. A etapa da hibridização aumenta a especificidade do teste.

A última etapa, a detecção do RNA viral, é feita após a fixação do conjugado avidina-peroxidase de rato silvestre ao material genético dentro dos micropoços. Inicialmente, uma lavagem elimina o excesso de conjugado não fixado. Em seguida, são adicionadas duas substâncias: o peróxido de hidrogênio e a 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). A enzima peroxidase, fixada no material genético, catalisa a oxidação do TMB para formar um complexo colorido que foi verificado em leitor automatizado.

### Descrição do teste

- *Preparação da amostra:*

O RNA do VHC foi isolado do soro por meio da lise das partículas virais com agente específico de lise (tampão Tris-HCL, 68% de tiocianato de guanidina, 3% de ditioneitol, < 1% de glicogênio, Xn 68% (p/p) de tiocianato de guanidina), seguido de uma precipitação do RNA viral com 1 ml de etanol a 70% e de centrifugação a 13000 x g, durante cinco minutos a temperatura ambiente. Foi descartado o sobrenadante. Posteriormente, foi adicionado o diluente (tampão Tris-HCL, < 0,005% de poli rA RNA – sintético, EDTA, 0,05% de azida sódica) e o pellet foi descolado com pipeta. A solução foi submetida ao vórtice para mistura com o diluente durante dez segundos. Parte da mistura (50 µl), devidamente identificada como sendo a mistura principal de trabalho, foi utilizada para a etapa de transcrição e amplificação, que ocorreu dentro das três horas subseqüentes à preparação da amostra, e o restante dessa mistura foi congelado a -70°C.

- *Transcrição reversa e a amplificação por PCR*

Essa etapa ocorreu em área física separada da anterior, com todos os materiais reagentes previamente separados. O termociclador utilizado (*Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9600*) foi ligado 45 minutos antes de iniciado a etapa da transcrição e da

amplificação. Inicialmente, em um frasco denominado de mistura principal de HCV (HCV MMX) contendo oligonucleotídeos (<0,01% de dATP, dCTP, dGTP, dUTP), iniciadores (KY78, KY80), enzima termo estável (AmpEraseR), tampão de bicina e azida sódica; foi adicionada uma solução contendo 100  $\mu$ l de HCV Mn<sup>2+</sup> e efetuado suaves movimentos para a adequada mistura das soluções. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu$ l da mistura principal de trabalho, obtida na etapa de preparação da amostra, aos tubos de PCR previamente rotulados e contendo a solução HCV MMX. Os tubos foram colocados no termociclador, que foi programado da seguinte forma: Programa Hold 74, cinco minutos a 50°C; Programa Hold 75, 30 minutos a 62°C; Programa Cycle 37 ciclos – 76: dez segundos a 90°C, 25 segundos a 58°C e Programa Hold 77, duas horas a 91°C. Após isso, as tampas do tubo de ensaio foram retiradas cuidadosamente para não criar aerossóis; e imediatamente pipetados 100  $\mu$ l da solução desnaturante, utilizando-se uma pipeta multicanal com barreira para aerossóis. A nova solução foi incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente e depois colocada em geladeira (4°C) até o dia seguinte, quando foi realizada a detecção.

- *Detecção*

Essa etapa ocorreu na mesma área física da etapa da amplificação. Aguardou-se até que todos os reagentes tivessem atingido a temperatura ambiente antes de retirá-los das embalagens de alumínio. Depois, foi preparada a solução de lavagem, adicionando 1 volume de 10XWB (concentrado de lavagem – 10X) a 9 volumes de água deionizada. Foi preparado o substrato de trabalho misturando 2 ml do substrato A com 0,5 ml do substrato B. Além disso, o *amplicon* armazenado em geladeira no dia anterior foi incubado a 37°C durante três minutos.

As tiras a serem utilizadas foram colocadas na placa de micropoços e em cada poço foram adicionados 100  $\mu$ l de HCV HYB (tampão de hibridização do HCV). Depois, utilizando-se ponteiros com barreira, foram pipetados 25  $\mu$ l de amplicon desnaturado e colocado nos poços. Foram dadas de dez a 15 suaves pancadas no prato onde se encontra a placa para a adequada mistura. A mudança de cor, do azul para amarelo claro, foi a indicação de que houve uma mistura adequada. Nesse momento, a placa de micropoços foi fechada com tampa própria e incubada a 37°C durante 60 minutos.

Após esse período foi realizada a lavagem manual da placa, por cinco vezes, com a solução de lavagem de trabalho. Depois de seca, foram adicionados 100  $\mu$ l de AV-HRP (conjugado de avidina-peroxidase de rato silvestre) a cada poço da placa. Esta foi novamente coberta e incubada a 37°C durante 15 minutos. Depois foi lavada de forma idêntica à lavagem anterior. Finalmente, foram adicionados 100  $\mu$ l da solução Stop (reagente de paragem), que interrompe a ação da enzima peroxidase. Após este procedimento, foi lida a absorbância a 450nm (A450), nos 30 minutos subseqüentes.

- *Interpretação dos resultados*

O resultado do exame de pesquisa do RNA viral foi interpretado conforme o esquema abaixo:

Tabela 1: Critérios de interpretação da pesquisa qualitativa de RNA do VHC

<b>Resultado do plasma analisado</b>	<b>Resultado do controle interno</b>	<b>Interpretação</b>
<b>Absorbância</b>		
< 0,3	$\leq 0,3$	RNA do VHC não detectado – EXAME NEGATIVO
0,3	< 0,3	Reação inibida. Exame foi repetido com o soro armazenado.
$\leq 0,3$	Qualquer	RNA do VHC detectado – EXAME POSITIVO
<0,3 e < 1,0	Qualquer	DUVIDOSO. Exame foi repetido com nova amostra

### **Teste HCV RNA quantitativo**

O teste HCV RNA 3.0 (bDNA) *VERSANT* - Bayer é um procedimento de hibridização tipo sanduíche do ácido nucléico para a quantificação direta do RNA do vírus da hepatite C (HCV) no soro e plasma humanos. Depois que o RNA genômico do HCV é liberado dos vírions, o RNA é capturado em um micropoço por uma série de sondas de captura específicas, compostas de oligonucleotídeos sintéticos. Um conjunto de sondas-alvo hibridiza com ambos o RNA viral e as sondas pré-amplificadoras. As sondas de captura e as sondas-alvo ligam-se ao segmento 5' da região não traduzida e às regiões centrais do genoma do VHC. A sonda amplificadora se hibridiza em seguida ao pré-amplificador formando um complexo de DNA ramificado (bDNA).

Uma série de cópias de uma sonda marcada com fosfatase alcalina hibridiza-se então com esse complexo imobilizado. A detecção ocorre pela incubação do complexo ligado ao AP com um substrato quimioluminescente. A emissão de raios luminosos é diretamente relacionada à quantidade de RNA do VHC presente em cada amostra e o resultado é registrado pelo luminômetro como unidades relativas de luz (RLUs). Define-se uma curva padrão pela emissão de raios luminosos de padrões que contêm concentrações conhecidas de fagos de DNA recombinante em fita única. As concentrações de HCV RNA nas amostras são determinadas a partir dessa curva padrão.

O teste seguiu as recomendações do fabricante, conforme consta no manual, sendo realizado em duas etapas. No primeiro dia foi realizado o processo de separação do genoma viral. O diluente de lise previamente aquecido foi misturado às sondas de captura, sondas-alvo e soro do paciente. Essa mistura foi colocada nos poços de captura do VHC, dentro das placas metálicas do sistema. O analisador fechou as placas automaticamente e iniciou o aquecimento até atingir a temperatura de incubação, que ocorreu durante o período noturno. A incubação durou de 15 a 18 horas. No teste, havia um controle negativo (ausência do vírus da hepatite C) e dois controles positivos, sendo um com alta carga viral e outro com baixa carga viral.

No segundo dia, foram realizados os procedimentos de hibridização da sonda de pré-amplificação e de amplificação. Nessa etapa, após a adição de reagentes específicos, ocorreu o resfriamento e a lavagem da(s) placa(s). O ciclo de lavagem/resfriamento do 2º dia levou aproximadamente 15 a 20 minutos dependendo da temperatura ambiente e do número de tiras a ser lavado. Em seguida, houve a etapa da amplificação, de detecção e de leitura.

Após a incubação, o analisador leu automaticamente as contagens de luminescência RLU das placas e transferiu os dados para o software de gerenciamento de dados. Uma curva foi montada e permitiu fazer análise crítica do comportamento dos padrões, dos controles e dos testes.

Os dados finais do Sistema Teste HCV RNA quantitativo são registrados como unidades relativas de luz (RLUs). A luz emitida é diretamente correlacionada ao número de

cópias do HCV RNA/mL (c/mL). O software de gerenciamento de dados relata os resultados do teste em cópias/mL e Unidades Internacionais (UI/mL) da Organização Mundial de Saúde.

Uma curva logística de 4 parâmetros é utilizada para modelar o logaritmo das RLUs como uma função da concentração de HCV RNA.

O *software* usa as RLUs observadas e as concentrações dos cinco pontos da curva-padrão para determinar a curva que apresenta o melhor ajuste para fazer o gráfico da curva-padrão e calcular a concentração de HCV RNA de cada controle e de cada amostra de paciente. A curva-padrão é calculada a partir de nove micropoços.

O teste é considerado válido se ocorrerem todas as condições abaixo:

- Os valores determinados dos controles positivos HCV estão dentro do intervalo especificado.
- As unidades relativas de luz (RLUs) para os padrões são média geométrica RLU Std A >RLU Std B >RLU Std C >RLU Std D >RLU Std E.
- O controle negativo para HCV tem um valor <3.200 cópias/mL.

Valores de Referência: O teste registra valores entre 3.200 cópias/mL (615 UI/mL) e 40 000 000 cópias/mL (7.692.000 UI/mL).

### **Genotipagem**

#### *Extração do RNA*

O RNA foi extraído utilizando-se um Kit comercial QIAamp Viral RNA (Qiagen), conforme as instruções do fabricante.

#### *Transcrição Reversa*

Após a extração do RNA, a reação de transcrição reversa foi realizada num volume final de 20 $\mu$ l. Inicialmente, uma solução contendo 5 $\mu$ l de RNA viral, 0,2  $\mu$ g de oligonucleotídeos randômicos (*Promega*), 0,625mM de cada dNTP (*Invitrogen*) e água Milli Q para um volume final de 13 $\mu$ l, foi mantida a 65°C por 5 minutos e, imediatamente, transferida para um recipiente com gelo, por um minuto. Em seguida, foi adicionado 0,75X de tampão

*first-strand*, 5mM de ditioneitol (DTT), 200U da enzima SuperScript™ transcriptase reversa (*Invitrogen*) e 40 unidades (U) de inibidor de RNases (*Invitrogen*). Esta reação foi inicialmente incubada a 25°C por 5 minutos e então a 55°C por 60 minutos. A reação foi interrompida, com a inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C.

#### Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras foram amplificadas por meio de *nested* PCR, utilizando-se *primers* específicos para a região 5' UTR, NS5B e E2. Para a região 5' UTR no primeiro ciclo, foram usados os *primers* externos P7/P8, e, no segundo ciclo, os *primers* internos P10/P17. A Tabela 2 mostra as seqüências de oligonucleotídeos usados para amplificação da região 5'UTR. O PCR foi realizado num volume final de 50  $\mu$ l com 1 $\mu$ l de cDNA, 2,5 mM de dNTPs, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,7 $\mu$ M *primers* extenos (P7/P8) e 2U da enzima *Taq Polimerase* (*Invitrogen*).

Tabela 2: Seqüência de oligonucleotídeos usados para amplificação da região 5'UTR do genoma do HCV

<i>Primer</i>	Seqüência (5' → 3')	Posição no Genoma
P7	CACTCCCCTGTGAGGAAGTACTGTC	-304 ao 280
P8	ATGGTGCACGGTCTACGAGACCTCC	+ 3 ao -23
P10	TTCACGCAGAAAGCGTCTAGCC	-279 ao -258
P17	GGGCACTCGCAAGCACCTATCAGG	-26 ao -50

P7/P8 *primers* externos; P10/P17 = *primers* externos

As amostras foram amplificadas num termociclador (*PTC-100 Research INC*) usando-se os seguintes parâmetros de amplificação: um ciclo de desnaturação de 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto; e, extensão final a 72°C por 7 minutos. Um microlitro do produto de PCR foi submetido a uma segunda amplificação com os *primers* internos (P10/P17), nas mesmas condições e usando-se o mesmo parâmetro de amplificação.

As amostras amplificadas foram analisadas em gel de agarose 1% e coradas com brometo de etídeo. O fragmento esperado para o produto de DNA amplificado para região 5'UTR foi de 253 pb.

Para a região NS5B (Tabela 3), foram usados os *primers* externos S1/AS1 no primeiro

ciclo e no segundo ciclo, os *primers* internos S2/AS2. A Tabela 3 mostra as seqüências utilizadas para amplificação da região NS5B. A reação de amplificação foi realizada com 5 $\mu$ l de cDNA, 2,5mM de dNTPs e 0,25 $\mu$ M de *primers* externos (S2/AS2) e 2U de *Taq polimerase* (*Invitrogen*), num volume final de 50 $\mu$ l. Todas as amostras foram submetidas à amplificação em um termociclador. Após uma desnaturação inicial de 95°C por 1 minuto, o DNA foi amplificado em 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão de 72°C por 10 minutos. Quatro microlitros do produto da primeira amplificação foram submetidos a um segundo ciclo usando os *primers* internos (S2/AS2), nas mesmas condições de amplificação, com 25 ciclos para amplificação. As amostras amplificadas foram analisadas em gel de agarose 1% e coradas com brometo de etídeo. O fragmento esperado para o produto de DNA amplificado para região NS5B é de 331 pb.

Tabela 3: Seqüência de oligonucleotídeos usados para amplificação da região NS5B do genoma do HCV

<i>Primer</i>	Seqüência (5' $\rightarrow$ 3')	Posição no Genoma
S1	TGG GGT TCT CGT ATG ATA CCC	8245 - 8265
AS1	CCT GGT CAT AGC CTC CGT GAA	8616 - 8636
S2	GAT ACC CGC TGC TTT GAC TC	8258 - 8278
AS2	CCT CCG TGA AGG CTC TCA G	8607 - 8625

S1/AS1 *primers* externos; A2/AS2 = *primers* externos

Para o estudo de variabilidade genética as amostras foram amplificadas por meio de *nested PCR*, utilizando-se *primers* específicos para a região HVR1 no gene E2. No primeiro ciclo foram usados os *primers* externos ES1/EAS1 e, no segundo ciclo, os *primers* internos ES2/EAS2. Os *primers* foram desenhados *in house*, utilizando o programa *FastPCR*. Com isso, espera-se uma melhor amplificação da região desejada. A Tabela 4 mostra as seqüências utilizadas para amplificação da região do envelope.

O primeiro ciclo de amplificação foi realizado em um volume final de 50 $\mu$ l, contendo 4  $\mu$ l de cDNA, 0,2 mM de dNTPs (*Invitrogen*), 0,5 $\mu$ l dos *primers* (ES1/EAS1) e 2U de *Taq polimerase* (*Invitrogen*). A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação de 95° C por 1 minuto; 40 ciclos de 95°C por 30 segundos; 56°C por 40 segundos; 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e, uma extensão de 72°C por 10 minutos.

Tabela 4: Seqüência de oligonucleotídeos usados para amplificação da região do envelope genoma do HCV

<b>Primer</b>	<b>Seqüência (5' → 3')</b>	<b>Posição no Genoma</b>
ES1	TCG GCC CTC TAC GTG GGG GAC	1164 - 1185
EAS1	CCT CTC AGG ACA GCC TGA AGA GT	1689 - 1722
ES2	CCT TCT CTC CCA GGC GCC ACT GG	1223 - 1246
EAS2	GGC CGT GCT ATT GAT GTG CCA ACT	1612 - 1635

ES1/EAS1 *primers* externos; EA2/EAS2 = *primers* externos

O segundo ciclo de amplificação foi realizado usando 3 microlitros do produto de PCR gerado na primeira amplificação, 0,2mM de dNTPs (*Invitrogen*), 0,5 $\mu$ l dos *primers* (ES2/EAS2) e 2U de *Taq polimerase* (*Invitrogen*), usando as mesmas condições de amplificação.

As amostras amplificadas foram analisadas em gel de agarose 1% e coradas com brometo de etídeo. O fragmento esperado para o produto de DNA amplificado para região HVR1 é de 389 pb. As amostras não amplificadas foram consideradas negativas para a presença de HCV, de acordo com a metodologia utilizada.

Para monitorar uma possível contaminação nos procedimentos de amplificação, foram sempre incluídos controles negativos, essenciais para avaliar o risco de contaminação cruzada e conseqüentes resultados falsos positivos.

#### *Genotipagem*

#### *Precipitação dos produtos de PCR*

Os produtos de PCR foram precipitados, adicionando-se 0,5 volume de acetato de amônio 7,5M e 2,5 volumes de etanol absoluto. As soluções foram mantidas a -80°C por 30 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 14000 rpm por 40 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 100 $\mu$ l de etanol 70%. Os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e os tubos mantidos a 37°C para total secagem. Finalmente, foram adicionados 15 $\mu$ l de água MilliQ em cada tubo.

#### *Seqüenciamento automático*

Os produtos da amplificação precipitados foram submetidos ao seqüenciamento au-

tomático utilizando-se *primers* internos sense P17, para seqüenciamento da região 5' UTR, e S2, para seqüenciamento da região NS5B. Para a região HVR1 em E2, os produtos de PCR foram seqüenciados em ambas as direções, utilizando-se *primers* internos ES2/EAS2. As reações de seqüenciamento nucleotídico foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, utilizando-se o *Kit RT-Terminator*, no Sistema *Molecular Dynamics MegaBACE 500 plus* (GE Healthcare), e na plataforma de seqüenciamento da EMBRAPA – CENARGEN utilizando-se o *Kit ABI PRISM BigDye TM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* versão 3.1 (Applied Biosystems).

#### *Análise das seqüências*

A qualidade das seqüências obtidas na reação de seqüenciamento foi verificada por programa específico, e as homologias das seqüências nucleotídicas foram determinadas pelo programa *HCV-Blast*, disponível no site HCV Databases (<http://hcv.lanl.gov>). Nesse programa, as seqüências obtidas foram alinhadas com seqüências de HCV disponíveis no banco genômico HCV Databases (<http://hcv.lanl.gov>).

#### **Avaliação ecográfica**

Os pacientes do Grupo I, em jejum de oito horas, realizaram ultra-sonografia de abdome superior na Unidade de Gastroenterologia do Hospital de Base, sempre com o mesmo examinador. O equipamento utilizado para os exames foi um aparelho de ultra-som de tempo real, marca Aloka, modelo SSD 1700 DYNAVIEW II, com medidores eletrônicos e transdutor linear com freqüência de 3,5, MHz, com *doppler* colorido, contínuo, pulsátil e com velocidade do ultra-som de 1.540 metros por segundo.

#### **Avaliação histológica**

Os fragmentos de biópsia hepática foram obtidos por punção intercostal direita, sob anestesia local e guiada por ecografia com agulha tipo corte (*Tru-Cut*<sup>®</sup>). O procedimento foi realizado pelo pesquisador, na unidade de Gastroenterologia do Hospital de Base, e o paciente permaneceu em repouso por período mínimo de 04 horas. O material obtido foi fixado em formol a 10% e encaminhado à unidade de Anatomia Patológica do Hospital de Base. Nessa unidade, o material foi submetido à desidratação em álcool etílico e banhos de xilol. Posteriormente, houve a inclusão do material em parafina. Os cortes histológicos

foram obtidos em micrótomo convencional e corados pela hematoxilina-eosina, tricômio de Masson, azul da Prússia (método de Perls) e detecção de fibras reticulares pelo método de Gomori.

A biópsia para ser incluída no estudo tinha no mínimo 15 mm de comprimento e pelo menos 10 espaços-porta. Além disso, para evitar a variabilidade entre observadores, outra limitação dos estudos baseados na avaliação histológica, as amostras do presente trabalho foram revisadas por um patologista experiente, sem conhecimento da condição clínica e dos exames laboratoriais do paciente.

O grau de fibrose foi classificado como:

- Ausência de fibrose portal e periportal - F0
- Fibrose portal e periportal sem septos – F1
- Fibrose portal e periportal com raros septos – F2
- Fibrose portal e periportal com numerosos septos – F3
- Cirrose – F4

O grau de infiltrado inflamatório no espaço-portal foi baseado na intensidade do mesmo e graduado como:

0. Raros linfócitos portais
1. Aumento discreto dos linfócitos portais
2. Aumento moderado dos linfócitos portais
3. Aumento acentuado dos linfócitos portais
4. Aumento muito acentuado dos linfócitos portais

O grau de infiltrado peri portal ou hepatite de interface foi classificado como:

0. Ausente
1. Necrose focal, ao redor de alguns espaços-porta.
2. Necrose difusa, ao redor de alguns espaços-porta ou focal ao redor de todos os espaços-porta.

### 3. Necrose acentuada, difusa e ao redor de todos os espaços-porta.

A necrose lobular corresponde a focos de necrose e/ou infiltrado inflamatório intra-lobulares e foi classificada como:

- Ausente ou mínima: menos de um foco por lóbulo – L0
- Moderada: pelo menos um foco por lóbulo – L1
- Acentuada: vários focos por lóbulo – L2

O grau de atividade necroinflamatória foi avaliado no espaço-portal, periportal e lobular. Posteriormente, foi utilizada a classificação de Metavir<sup>148</sup> que integra a intensidade da inflamação e necrose no espaço periportal, denominada de hepatite de interface (HI) com a necrose lobular (NL), conforme listado a seguir:

- A0: nenhuma atividade necroinflamatória histológica.
- A1: atividade necroinflamatória histológica mínima.
- A2: atividade necroinflamatória histológica moderada.
- A3: atividade necroinflamatória histológica severa

Assim, atividade inflamatória (AI) foi definida conforme o seguinte esquema:

- A0 quando existia HI 0 associado a L0.
- A1 quando existia HI 0 associado a L1.
- A1 quando existia HI 1 associado a L0 ou L1.
- A2 quando existia HI 0 associado a L2
- A2 quando existia HI 1 associado a L2
- A2 quando existia HI 2 associado a L0 ou L1.
- A3 quando existia HI 2 associado a L2

- A3 quando existia HI 3 associado a L0, L1 ou L2.

O grau de siderose hepática foi realizado baseado na classificação de Searle<sup>149</sup> que estabelece:

- Ausência de ferro hepático
- Grânulos de ferro visíveis ao aumento de 400x
- Grânulos de ferro visíveis ao aumento de 100x
- Grânulos de ferro visíveis ao aumento de 25x
- Massas de grânulos de ferro visíveis ao aumento de 10x ou a olho nu.

### 3.4 Análise estatística

Os dados descritos foram apresentados como percentual ou média com desvio padrão e variações mínima e máxima. As variáveis categóricas foram analisadas com os testes qui-quadrado e teste exato de Fisher. O teste T de *Student* e o de Mann-Whitney foram usados para comparação das variáveis numéricas. Modelos de regressão logística foram usados para calcular *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95%. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$  (alfa=5%). Todos os cálculos foram feitos por meio do programa de estatística SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) modelo 13.0.

## 4 Resultados

No ambulatório de hepatologia do Hospital de Base do DF, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2006, 68 pacientes portadores de insuficiência renal crônica, em tratamento regular de hemodiálise, submeteram-se à avaliação de doença hepática. Desses, um paciente apresentava sinais de doença hepática descompensada (ascite); um paciente era portador de hipertensão portal por esquistossomose e do vírus da hepatite C; dois apresentavam marcadores sorológicos de infecção pelo vírus da hepatite B e C; 18 eram portadores do vírus da hepatite B (HBsAg positivo); 08 pacientes apresentavam sorologia positiva para o VHC (anti-HCV positivo), mas pesquisa do RNA viral ausente, e 02 pacientes apresentavam infecção pelo VHC, mas a biópsia hepática não foi adequada para avaliação. Estes pacientes foram excluídos do estudo. Dessa forma, do total de 68 pacientes avaliados, 36 entraram no atual estudo. Os dados coletados destes pacientes encontram-se no anexo 1.

A etiologia mais freqüente da doença renal crônica foi a hipertensão arterial, observada em 9 (25%) pacientes, seguida pela glomerulonefrite crônica e por diabetes mellitus, que foram verificados em 7 (19.4%) e 5 (13.9%) pacientes, respectivamente. Dez pacientes (27.7%) não tiveram a etiologia da doença renal estabelecida, sendo considerada idiopática, e 05 apresentavam outras patologias renais tais como: hipoplasia renal, pós-parto, obstrutiva, lúpus eritematoso sistêmico, pielonefrite crônica.

Os achados mais freqüentes observados na ecografia de abdome superior dos pacientes com IRC e correlacionados com a viremia do VHC foram:

- Tamanho do fígado:
  - Normal em 27 pacientes (75%);
  - Aumentado em 07 pacientes (19,5%);
  - Diminuído em 02 pacientes (5,5%);
- Aspecto do fígado:
  - Homogêneo em 31 pacientes (86,1%);
  - Heterogêneo em 05 pacientes (13,9%);

- Outros achados:
  - Esplenomegalia: 06 pacientes (16,7%);
  - Hiperecogenicidade, aspecto compatível com esteatose hepática: 08 pacientes (22,2%);
- Nenhum paciente apresentava sinais de hipertensão portal ou ascite.

Os dados referentes aos pacientes em hemodiálise podem ser vistos na Tabela 5.

Tabela 5: Características gerais dos pacientes em hemodiálise

Variáveis	Pacientes em HD (n=36)
	Média ± DP (variação) ou n (%)
Idade (anos)	41 ± 10 (23-68)
Sexo: masculino / feminino	22 (61.1) / 14 (38.9)
Tempo de infecção (anos)	12.31 ± 3.80 (6-25)
Tempo de hemodiálise (anos)	8 ± 3 (2-16)
Transfusão de sangue	22 (61%)
Transplante renal	13 (36%)
Índice de Massa Corporal	21.80 ± 2.31 (17.01-28.33)
DM: sim / não	5 (13.9) / 31 (86.1)
Genótipo: 1 / 2 / 3	29 (80.5) / 0 (0) / 7 (19,5)
Carga viral (UI/ml) x 10 <sup>3</sup>	380 ± 641 (0.6-3 390)
ALT (U/L)	26 ± 15 (11-85)
Plaquetas x 10 <sup>3</sup>	214 ± 52 (130-386)
Albumina (g/dl)	3.63 ± 0.40 (2.1-4.2)
Proteína total (g/dl)	6.83 ± 0.37 (5.9-7.4)
Saturação de transferrina (%)	60.69 ± 46.54 (18-196)

HD = hemodiálise; DP = desvio-padrão.

A idade média dos 36 pacientes em hemodiálise foi de 41 anos, variando de 23 a 68 anos, com desvio padrão de 10 anos. Vinte e dois pacientes (61,1%) eram do sexo masculino e 14 (38,9%), do sexo feminino. Estavam em programa de hemodiálise num tempo médio de 8 ± 3 anos, com variação de 02 a 16 anos. Dos 36 pacientes em hemodiálise, 22 (61%) relatavam história de transfusão de sangue antes ou durante o tratamento dialítico e 13 (36,1%) pacientes já tinha realizado transplante renal, com perda do enxerto e retorno ao programa de hemodiálise há pelo menos um ano. O tempo estimado de infecção, calculado a partir do primeiro fator de risco para a aquisição do vírus ou início de hemodiálise, foi de

12,31 anos, com desvio padrão de 3.80 e variando 05 a 25 anos. O diagnóstico de diabetes mellitus foi estabelecido em cinco pacientes (13.9%).

Somente 04 (11.1%) pacientes no grupo de pacientes em HD apresentavam ALT acima do limite superior da normalidade, sendo que a média dessa enzima hepática nesse grupo foi de  $26 \pm 15$ , com variação de 11 a 86 U/L. Oito pacientes (22,2%) apresentavam albumina abaixo do limite inferior da normalidade (normal = 3,3 mg/dl) e a média entre esse grupo de pacientes foi de 3.63 com desvio padrão de 0,40 e variando de 2.1 a 4.2.

A carga viral média foi de 380 000 UI/ml. Quatro pacientes apresentavam pesquisa de RNA do VHC positivo (limite de detecção – 50 cópias/ml), mas o teste quantitativo estava abaixo do limite mínimo, que era de 615 UI/ml, que corresponde a 3200 cópias de vírus/ml. Sete pacientes (19,5%) apresentavam genótipo 3a e 29 pacientes o genótipo 1, sendo que 25 (86%) apresentava o genótipo 1b.

Os achados histológicos nos pacientes em hemodiálise são descritos nas figuras 2, 3, 4 e 5.

Na figura 2 verifica-se a distribuição do grau de fibrose. Dezenove pacientes (52,8%) não apresentaram fibrose. Dentro do grupo de pacientes que apresentou algum grau de fibrose, 30,6% (n=11) apresentaram grau discreto de fibrose (Metavir 1), 11,1% (n=04) apresentaram grau 2 e 5,5% (n=02) apresentaram grau 3 e nenhum paciente apresentou grau 4 de fibrose, correspondente ao estágio de cirrose hepática.

A presença da inflamação e o grau da atividade inflamatória foram avaliados nos segmentos portal, periportal e lobular. Observa-se, na figura 3, que a inflamação portal esteve presente em 86,2% (31/36) dos pacientes, sendo que 63.8% (23/36) apresentavam processo inflamatório discreto (grau 1), 19.4% (07/36) apresentavam grau moderado (grau 2) e somente um paciente (2.7%) tinha grau acentuado de inflamação nesse segmento do lóbulo hepático. Dessa forma, somente 13,8% (05/36) não apresentavam processo inflamatório na região portal.

Verifica-se, em relação ao processo inflamatório periportal, também denominado de hepatite de interface ou necrose em saca bocado e considerado como uma reação inflamatória mais grave, que 61,1% (n=22) dos pacientes não a apresentavam. Necrose focal, presente

somente ao redor de alguns espaços-porta, classificada como grau 1, foi verificada em 08 pacientes (22,2%). Necrose difusa presente ao redor de alguns espaços-porta ou focal, observada ao redor de todos os espaços-porta (grau 2), foi verificado em 06 pacientes (16,7%) e nenhum paciente apresentava necrose acentuada, difusa e ao redor de todos os espaços-porta (grau 3).

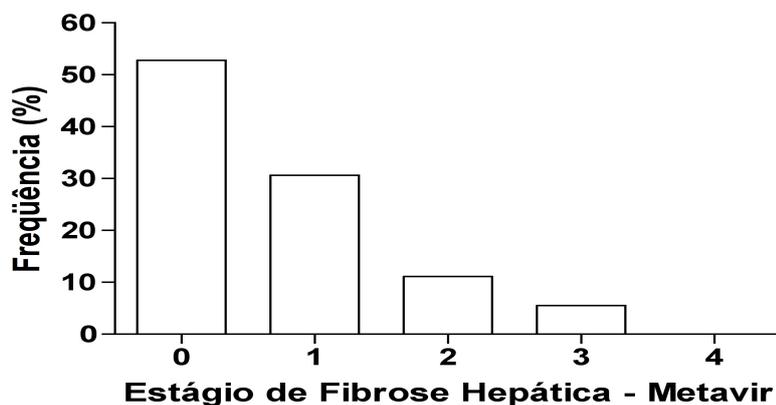


Figura 2: Estágio de fibrose hepática (Metavir) em pacientes portadores de IRC em hemodiálise

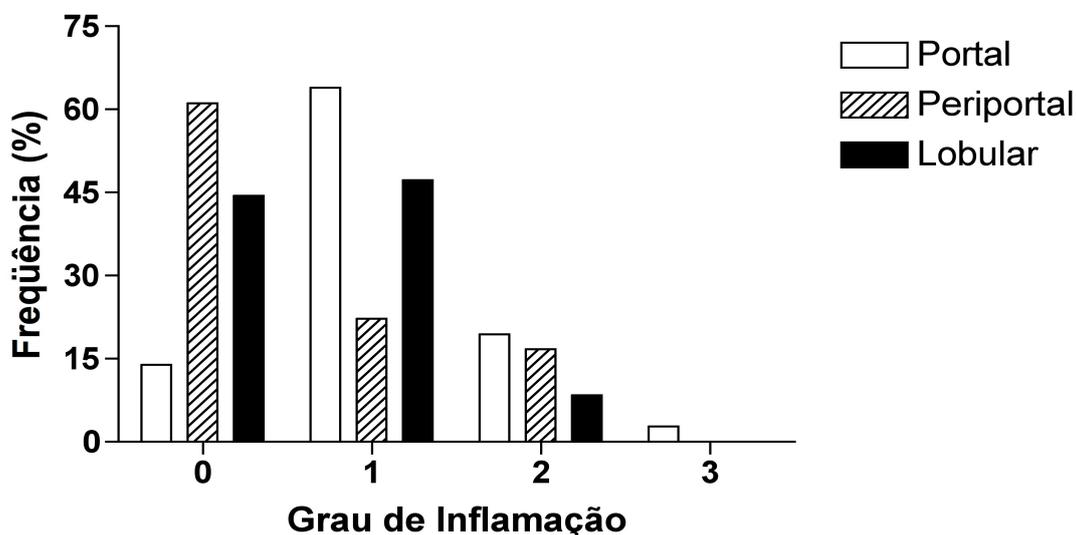


Figura 3: Distribuição intralobular do processo inflamatório hepático e grau de atividade inflamatória nos pacientes em hemodiálise.

As alterações no parênquima hepático, com necrose de hepatócito e afluxo de infiltrado inflamatório mononuclear, que poderá gerar a formação de necrose em ponte e posterior fibrose, podem ser avaliadas também na figura 3. Verifica-se que 44,4% (n=16) não apresentaram inflamação lobular e 17 pacientes (47,2%) apresentavam grau discreto de

inflamação lobular. Assim, 91,6% foram classificados como L0. Somente 3 pacientes (8,4%) tinham grau moderado de inflamação parenquimatosa (L1) e nenhum paciente apresentou grau acentuado de necrose e ou infiltrado inflamatório intralobular (L2).

O grau de atividade necroinflamatória tecidual, definida pela classificação Metavir como uma associação entre os infiltrados inflamatórios no espaço lobular e periportal, pode ser verificado na figura 4.

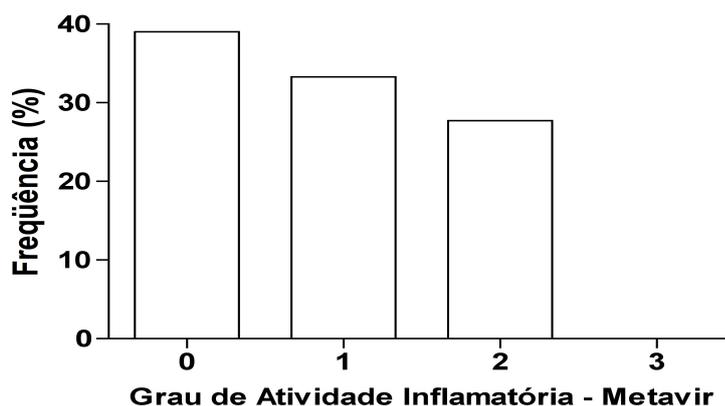


Figura 4: Graus de atividade inflamatória (Metavir) nos pacientes em hemodiálise

Quatorze pacientes (39%) apresentaram ausência de atividade inflamatória (Metavir 0) na biópsia. Doze pacientes (33,3%) foram classificados como portadores de atividade inflamatória grau 1, e 10 pacientes (27,7%) como AI grau 2. Nenhum paciente foi classificado como tendo grau acentuado de atividade inflamatória.

A presença de agregado linfóide, esteatose e lesão de ducto biliar, três aspectos histológicos da hepatite crônica C, podem ser verificados na tabela 6.

Tabela 6: Marcadores histológicos de hepatite crônica C nos pacientes em hemodiálise

Marcador etiológico tecidual	N	%
Esteatose	6*	16,6
Acúmulo linfóide	4*	11
Lesão de ducto biliar	2*	5,5
Ausência de marcador	28	77,7

\* Podiam apresentar um ou mais marcadores

Verifica-se que 28 (77,7%) dos pacientes não apresentaram nenhum marcador histo-

lógico, sendo que a esteatose foi o marcador mais comum, identificado em seis pacientes. Agregados ou acúmulo linfóide, foi verificado em 04, e lesão de ducto biliar foi detectado em 02 pacientes. Três pacientes apresentavam esteatose e acúmulo linfóide e outro paciente apresentou esteatose e lesão de ducto biliar concomitante.

A presença de ferro tecidual foi avaliada pelo método de Pearls e pode ser visualizado na figura 5. Quatorze pacientes (38,9%) não apresentaram depósito de ferro no tecido hepático, contudo 61,1% apresentavam algum grau de depósito de ferro. Dentre esses, 27,8% (n=10) apresentam grau leve de ferro tecidual, 19,4% (n=07) grau 2, 11,3 (n=04) apresentavam grau 3 e um paciente (2,84%) apresentava grau 4 de ferro no tecido.

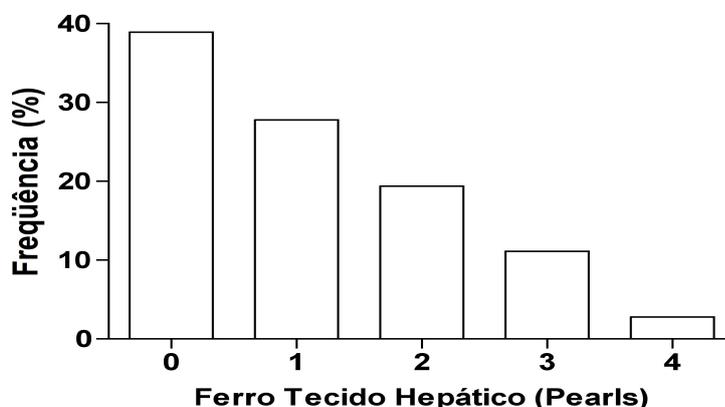


Figura 5: Graus de siderose hepática nos pacientes em hemodiálise

Para identificar os fatores relacionados com a presença de fibrose nos pacientes portadores de IRC em hemodiálise, foi realizada uma comparação entre aqueles que apresentavam algum grau de fibrose (n=17) com aqueles que não apresentaram nenhum grau de fibrose (n=19). Os fatores associados com a presença de fibrose estão descritos na tabela 7.

Verifica-se que nos pacientes com IRC em HD, o único fator relacionado com a fibrose foi a presença de atividade inflamatória acentuada ( $p=0,015$ ). Dos nove pacientes com grau de atividade inflamatória grave, definida como Metavir graus 2 e 3, oito apresentaram fibrose (88,9%). Em contraste, dos 27 pacientes que apresentaram AI graus 0 e 1, somente nove (33,3%) apresentaram fibrose. Dessa forma, a presença de fibrose foi significativamente mais freqüente nos pacientes com AI grave, quando comparado aos pacientes com atividade inflamatória ausente ou leve (Metavir 0 e I).

Tabela 7: Análise univariada dos fatores associados com fibrose hepática (Metavir - estágios 1-4) em pacientes em Hemodiálise

Variáveis	Fibrose/ Pacientes em HD (% ou Média ± DP) Fibrose x Média ± DP Não-Fibrose	OR (IC 95%)	p-valor
Idade (anos)	17/36 (43.71 ± 11.75 x 40.32 ± 9.42)	1.032 (0.967 - 1.102)	0.335
Sexo: Masc / Fem	12/22 (54.5%) / 5/14 (35.7%)	2.16 (0.544 - 8.570)	0.273
Tempo de infecção (anos)	17/36 (11.94 ± 3.34 x 12.63 ± 4.23)	0.951 (0.795 - 1.138)	0.584
Hemodiálise: Sim / Não	17/36 (7.76 ± 2.65 x 8.47 ± 4.11)	0.941 (0.774 - 1.143)	0.537
IMC: ≥ 25 / < 25	1/3 (33.3%) / 16/33 (48.5%)	0.531 (0.044 - 6.444)	0.619
DM: Sim / Não	1/5 (20%) / 16/31 (51.6%)	0.234 (0.023 - 2.342)	0.217
Atividade inflamatória: 2-3 / 0-1	8/9 (88.9%) / 9/27 (33.3%)	16 (1.725 - 148.431)	0.015*
Esteatose: Sim / Não	4/6 (66.7%) / 13/30 (43.3%)	2.615 (0.413 - 16.544)	0.307
Agregado linfóide: Sim / Não	0/2 (0%) / 17/34 (50%)	0.000 (0 - 0)	0.999
Lesão biliar: Sim / Não	1/1 (100%) / 16/35 (45.7%)	191837640 (0 - 0)	1.000
Pearls (grau 2-4): Sim / Não	3/12 (25%) / 14/24 (58.3%)	0.238 (0.051 - 1.109)	0.067
<i>Carga viral (UI/ml)</i>			
≥ 400 000 / < 400 000	5/9 (55.6%) / 9/21 (42.9%)	1.67 (0.346 - 8.038)	0.525
Genótipo: 1 / Não-1	12/29 (41.4%) / 5/7 (71.4%)	0.282 (0.047 - 1.706)	0.168
ALT (U/L): ≥ 40 / < 40	2/4 (50%) / 15/32 (46.9%)	1.13 (0.142 - 9.065)	0.906
Albumina (g/dl): ≥ 3.5 / < 3.5	11/27 (40.7%) / 6/9 (66.7%)	2.909 (0.597 - 14.185)	0.186
Sat. Transferrina (%): ≥ 50 / < 50	12/22 (54.5%) / 5/14 (35.7%)	2.160 (0.544 - 8.570)	0.273

OR = odds ratio; DP = desvio-padrão; IC = intervalo de confiança; IMC = índice de massa corporal; DM = diabetes mellitus; ALT = alanina aminotransferase.

Outros parâmetros histológicos, inclusive a presença de ferro tecidual, não mostraram correlação com a presença de fibrose hepática nos pacientes com insuficiência renal. Também não houve correlação de fibrose com dados demográficos, como sexo, idade, peso, tempo de infecção, tempo de hemodiálise e com dados laboratoriais como presença de Diabetes Mellitus, níveis de ALT, de albumina, de proteína total, de plaquetas e de saturação de transferrina. Além disso, não houve correlação de fibrose com dados virológicos, como genótipo e carga viral.

Em seguida, foi realizada uma comparação entre os portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise (n=36) com pacientes que apresentavam função renal normal e estavam infectados com o VHC (n=37), provenientes do ambulatório de hepatologia do Hospital de Base do DF, catalogados no banco de dados e com biópsia hepática disponível para revisão. Os dados estão mostrados na tabela 8.

Tabela 8: Análise univariada dos fatores associados com fibrose hepática (Metavir - estágios 1-4) em pacientes em Hemodiálise

Variáveis	Grupo em HD (n=36)	Grupo com FRN (n=37)	p-valor
	Média ± DP (variação) ou n(%)	Média ± DP (variação) ou n(%)	
Idade (anos)	41 ± 10 (23-68)	40 ± 11 (25-65)	0.699 <sup>a</sup>
Sexo			
Masc. / Fem	22 (61.1) / 14 (38.9)	23 (62.2) / 14 (37.8)	0.96 <sup>b</sup>
Hemodiálise (anos)	8 ± 3 (2-16)		
IMC	21.80 ± 2.31 (17.01-28.33)	25.01 ± 3.39 (20.06-37.8)	<0.001 <sup>a</sup>
DM - Sim	5 (13.9)	4 (10.8)	0.736 <sup>d</sup>
Genótipo: 1/2/3	29 (80.5) / 0(0) / 7 (19,5)	26 (70.2) / 1 (2,7) / (10 (27,1)	0.308 <sup>b</sup>
Carga viral (UI/ml) x 10 <sup>3</sup>	380 ± 641 (0.6-3 390)	1 010 ± 1 314 (2-5 245)	0.018 <sup>c</sup>
ALT (U/L)	26 ± 15 (11-85)	61 ± 30 (13-128)	<0.001 <sup>c</sup>
Plaquetas x 10 <sup>3</sup>	214 ± 52 (130-386)	224 ± 54 (115-325)	0.417 <sup>a</sup>
Albumina g/dl	3.63 ± 0.40 (2.1-4.2)	4.12 ± 0.31 (3.5-4.9)	<0.001 <sup>a</sup>
Proteína total (g/dl)	6.83 ± 0.37 (5.9-7.4)	7.54 ± 0.53 (6.5-8.9)	<0.001 <sup>a</sup>
Sat. de transferrina (%)	60.69 ± 46.54 (18-196)	41.46 ± 14.45 (21-72)	0.246 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Teste t de *student*; <sup>b</sup> Teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ); <sup>c</sup> Teste de Mann-Whitney; <sup>d</sup> Teste exato de Fisher; HD = hemodiálise; FRN = função renal normal; DP = desvio-padrão; IMC = índice de massa corporal; DM = diabetes mellitus; ALT - alanina aminotransferase

Os pacientes foram emparelhados em relação ao sexo, à idade, o tempo estimado da infecção e à história de transfusão de sangue. O índice de massa corporal nos pacientes em

HD ( $21.80 \pm 2.31$ ) foi significativamente menor que nos pacientes com função renal normal ( $25.01 \pm 3.39$ ;  $p < 0.001$ ). Nos pacientes em HD, também foram significativamente menores os níveis de ALT ( $26 \pm 15$  vs  $61 \pm 30$ ,  $p < 0.001$ ), de albumina ( $3.63 \pm 0.40$  vs  $4.12 \pm 0.31$ ;  $p < 0.001$ ) e de proteína sérica ( $6.83 \pm 0.37$  vs  $7.54 \pm 0.53$ ;  $p < 0.001$ ). A saturação de transferrina foi mais elevada nos pacientes em hemodiálise ( $60,69 \pm 46.54$  vs  $41.46 \pm 14.45$ ), porém não atingiu nível de significância estatística ( $p = 0.246$ ). A presença de diabetes mellitus também foi semelhante nos dois grupos.

O genótipo 1 foi o subtipo viral mais freqüente nos dois grupos de pacientes, sendo detectado em 70% (26/37) dos pacientes com função renal normal e 80,5% (29/36) naqueles em hemodiálise. A distribuição dos genótipos em ambos os grupos foi semelhante ( $p = 0.308$ ). No entanto, os pacientes com função renal normal apresentaram carga viral significativamente maior ( $1\,010 \pm 1\,314 \times 10^3$ ), quando comparados com aqueles em insuficiência renal, mantidos em tratamento dialítico ( $380 \pm 641 \times 10^3$ ), com  $p = 0,016$ .

A análise comparativa dos dados histológicos entre os pacientes em hemodiálise e aqueles com função renal normal estão da tabela 9.

A presença de esteatose e de agregados linfóides, duas características histológicas do VHC, foram significativamente mais freqüentes nos pacientes com função renal normal quando comparado aos pacientes em hemodiálise ( $p < 0,001$ ). No entanto, o outro marcador histológico de infecção pelo VHC, a lesão de ducto biliar, apresentou distribuição uniforme nos dois grupos.

A presença de ferro no tecido hepático foi observada em somente 27% (10/37) dos pacientes com função renal normal, enquanto que em 61,1% (22/36) dos pacientes em hemodiálise a coloração de Perls foi positiva, denotando a presença de ferro tecidual. Além disso, nos pacientes urêmicos o depósito de ferro foi mais intensa, havendo correlação estatística ( $p = 0.008$ ).

Dezenove pacientes (52.8%) em hemodiálise apresentaram ausência de fibrose na biópsia, enquanto que no grupo com função renal normal fibrose grau 0 foi verificada em 27% (n=10). A análise comparativa dos pacientes com ausência de fibrose em comparação com aqueles que apresentam qualquer grau de fibrose em ambos os grupos revela que

os pacientes em hemodiálise apresentam significativamente menor frequência de fibrose ( $p=0,025$ ). A figura 6 demonstra a distribuição da fibrose nos pacientes em hemodiálise e nos pacientes com função renal normal. Fibrose grau 4 (cirrose) não foi observado em nenhum paciente de ambos os grupos. Graus de fibrose avançada (Metavir 2 e 3) foi mais freqüente nos pacientes com função renal normal, porém sem atingir nível de significância estatística.

Tabela 9: Alterações hepáticas em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C em hemodiálise e com função renal normal

Variáveis	HD (n=36)	Função renal normal (n=37)	p-valor
	Média ± DP ou n (%)	Média ± DP ou n (%)	
<i>Estágio de Fibrose</i>			
0	19 (52.8)	10 (27)	0.025 <sup>a</sup>
1 - 4	16 (47.2)	27 (73)	
<i>Atividade inflamatória</i>			
0 - 1	26 (72.3)	15 (40.5)	0.003 <sup>a</sup>
2 - 3	10 (27.7)	22 (59.5)	
<i>Esteatose</i>			
Sim / Não	6 (16.3) / 30 (83.3)	21 (56.8) / 16 (43.2)	<0.001 <sup>a</sup>
<i>Agregado linfóide</i>			
Sim / Não	2 (5.6) / 34 (94.4)	16 (43.2) / 21 (56.8)	<0.001 <sup>b</sup>
<i>Lesão de ducto biliar</i>			
Sim / Não	1 (2.8) / 35 (97.2)	4 (10.8) / 33 (89.2)	0.358 <sup>b</sup>
<i>Ferro tecidual</i>			
0	14 (38.9)	27 (73)	0.008 <sup>a</sup>
1	10 (27.8)	7 (18.9)	
2	7 (19.4)	3 (8.1)	
3	4 (11.1)	0 (0)	
4	1 (2.8)	0 (0)	

<sup>a</sup> Teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ); <sup>b</sup> Teste exato de Fisher; HD = hemodiálise; DP = desvio-padrão

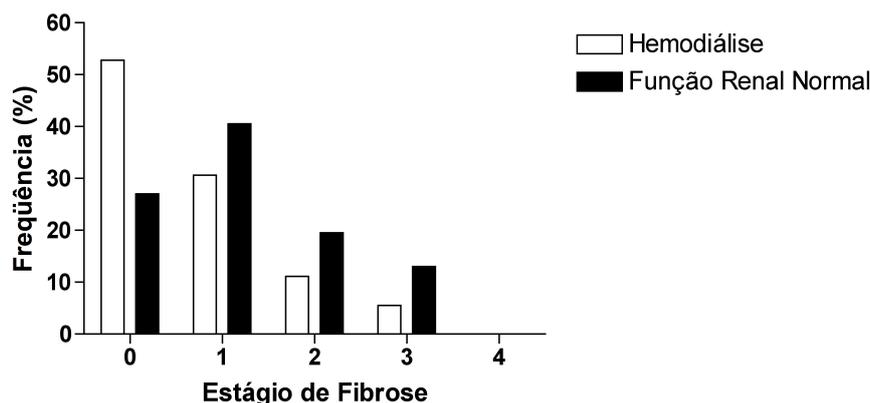


Figura 6: Distribuição do estágio de fibrose hepática (Metavir) nos pacientes infectados pelo vírus da hepatite C em hemodiálise e com função renal normal

Os dados referentes aos graus de atividade inflamatória encontram-se na figura 7. Quatorze pacientes (39%) em hemodiálise apresentaram grau 0 de atividade inflamatória, enquanto que no grupo com função renal normal isso ocorreu em somente 16% (6/37). Além disso, nenhum paciente com insuficiência renal apresentou Metavir grau 3, enquanto que nos pacientes com função renal normal, 19% (7/37) apresentaram grau máximo de atividade inflamatória. A análise comparativa dos pacientes que apresentaram atividade inflamatória grave, definida pela presença de Metavir graus 2 e 3, em comparação com aqueles com atividade inflamatória ausente ou discreta (Metavir graus 0 e 1) revelou que os pacientes com IRC em hemodiálise apresentaram menor proporção desse grau de atividade inflamatória comparada aos pacientes com função renal normal, com importante nível de significância estatística ( $p=0,003$ ).

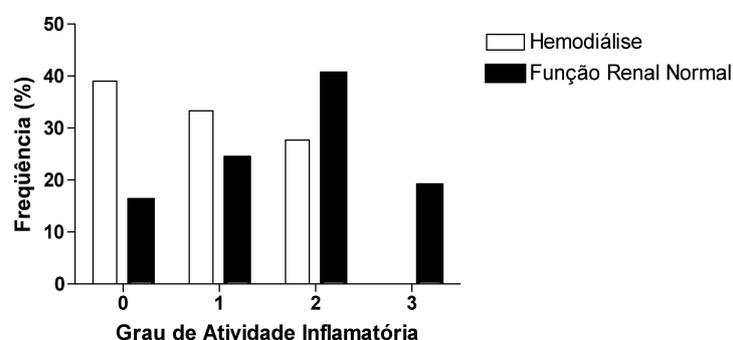


Figura 7: Distribuição do grau de atividade inflamatória (Metavir) nos pacientes infectados pelo vírus da hepatite C em hemodiálise e com função renal normal

O principal fator determinante para a progressão da doença hepática crônica e o surgimento das complicações é a presença e o grau de fibrose. Diante disso, foram avaliados os fatores associados à presença de fibrose nos dois grupos de pacientes, ou seja, aqueles em hemodiálise e aqueles com função renal normal. Adicionalmente, foi verificado se a hemodiálise poderia se constituir em fator de risco para a progressão da doença hepática. Para isso, foi realizada uma análise univariada e se constatou que quatro fatores estavam associados com a presença de fibrose hepática nos portadores do VHC: agregado linfóide, depósito de ferro no tecido hepático, grau de atividade inflamatória na biópsia hepática e a realização de hemodiálise (Tabela 10).

Tabela 10: Análise univariada dos fatores de risco associados com fibrose (Metavir - estágios 1-4) em todos os pacientes

Variáveis	Fibrose/Todos os Pacientes		p-valor
	Média ± DP Fibrose x Média ± DP Não-Fibrose	OR (IC 95%)	
Idade (anos)	44/73 (43.27 ± 11.18 x 38.59 ± 10.03)		0.076
Sexo Masc / Fem	29/45 (64.4%) / 15/28 (53.6%)		0.357
Tempo de infecção (anos)	44/73 (12.48 ± 3.46 x 12.34 ± 4.25)		0.882
Hemodiálise: Sim / Não	17/36 (47,2%) / 27/37 (73%)	0.331 (0.125-0.880)	0.027
IMC: ≥ 25 / < 25	12/17 (70.6%) / 32/56 (57.1%)		0.325
DM: Sim / Não	4/9 (44.4%) / 40/64 (62.5%)		0.307
Genótipo 1 / Não-1	31/55 (56.4%) / 13/18 (72.2%)		0.238
<i>Atividade inflamatória</i>			
2-3 / 0-1	28/31 (90.3%) / 16/42 (38.1%)	15.167 (3.957-58.137)	<0.001
Esteatose: Sim / Não	19/27 (70.4%) / 25/46 (54.3%)		0.180
Agregado linfóide: Sim / Não	15/18 (83.3%) / 15/18 (83.3%)	4.483 (1.165-17.255)	0.029
Lesão biliar: Sim / Não	5/5 (100%) / 39/68 (57.4%)		0.999
Pearls (grau 2-4): Sim / Não	5/15 (33.3%) / 39/58 (67.2%)	0.244 (0.073-0.813)	0.022
<i>Carga viral (UI/ml)</i>			
≥ 400 000 / < 400 000	20/28 (71.4%) / 21/39 (53.8%)		0.525
ALT (U/L): ≥ 40 / < 40	24/35 (68.6%) / 20/38 (52.6%)		0.167
Albumina (g/dl) ≥ 3.5 / <3.5	6/9 (66.7%) / 38/64 (59.4%)		0.676
Sat transferrina (%): ≥50 / <50	30/45 (66.7%) / 14/28 (50%)		0.160

OR – odds ratio; DP = desvio-padrão; IC – intervalo de confiança; IMC = índice de massa corporal; DM = diabetes mellitus;  
ALT = alanina aminotransferase.

A presença de fibrose hepática foi observada em 15 dos 18 pacientes que apresentavam agregado linfóide na biópsia, conferindo um risco 4.48 com IC 95%, variando de 1,16 a 17,25 ( $p= 0.029$ ). Dessa forma, os pacientes com agregado linfóide na biópsia tiveram maiores risco de apresentar fibrose hepática, quando comparados aos pacientes que não apresentaram esse marcador histológico da infecção causada pelo VHC.

O maior fator de risco para a ocorrência de fibrose, na análise univariada, foi a presença de atividade inflamatória grave (Metavir 2 e 3) na biópsia. Fibrose hepática foi verificada em 28 dos 31 pacientes (90,3%) com atividade inflamatória grave, em contraste com a presença de fibrose em 16 dos 42 (38.1%) que não apresentavam atividade inflamatória grave ( $p < 0.001$ ). Diante desses dados, podemos afirmar que os pacientes com atividade inflamatória grave apresentam um fator de risco 15.167 (IC 95%: 3.957-58.137) vezes maior de apresentar fibrose, quando comparado àqueles que não apresentam infamação grave na biópsia.

Fibrose hepática também foi verificada em 17 de 36 pacientes (47.2%) que estavam em tratamento de hemodiálise, enquanto que naqueles com função renal normal foi encontrada em 27 dos 37 pacientes (73%). Assim, os pacientes em hemodiálise apresentam um risco 3 vezes menor de apresentar fibrose quando comparado aos pacientes com função renal normal (fator de risco: 0.331; IC 95% 0.125-0.880;  $p= 0.027$ )

Cinco dos 15 pacientes (33.3%) que apresentavam importante depósito de ferro tecidual também apresentaram fibrose hepática. No entanto, 39 dos 53 pacientes (67.2%) que não apresentavam depósito de ferro no fígado apresentaram fibrose hepática. Dessa forma, os pacientes com menor grau de depósito de ferro apresentaram mais freqüentemente fibrose, quando comparados aos pacientes com intenso depósito de ferro, conferindo um fator de risco de 0.244, com IC 95%, variando de 0.073 a 0.813. Assim, pela análise univariada, o depósito importante de ferro (graus 2-4) no fígado ( $p= 0.022$ ) não acarretou maior agressão e fibrose ao tecido hepático.

A regressão logística multivariada (*forward stepwise*), demonstrada na Tabela 11 e realizada com os fatores de risco identificados na análise univariada, comprova que somente a presença de atividade inflamatória grave (Metavir 2 e 3) é fator de risco importante para a

presença de fibrose hepática, com  $p < 0,001$ . Nessa avaliação, foi verificado que os pacientes com esses graus de atividade inflamatória apresentam um risco 15 vezes maior (IC 95% 3.95 a 58.13) de apresentar fibrose, quando comparado aos pacientes sem inflamação ou com atividade inflamatória discreta (AI 0 e 1)

Tabela 11: Análise multivariada dos fatores associados com fibrose hepática

Variáveis	OR (IC 95%)	p-valor
Hemodiálise		0.401
Atividade inflamatória (graus 2 e 3)	15.167 (3.957 – 58.137)	<0.001
Agregado linfóide		0.169
Ferro (grau 2-4)		0.129

OR = *odds ratio* e IC = intervalo de confiança.

Diante das evidências de que a fibrose ocorria de forma mais freqüente nos pacientes com atividade inflamatória grave (Metavir graus 2 e 3), foi realizada a avaliação dos fatores de risco para a ocorrência da inflamação no tecido hepático. Esses dados estão na Tabela 12.

Foi constatado que 35 pacientes apresentaram ALT acima do limite da normalidade e, desses, 20 apresentavam grau de AI grave (Metavir 2 e 3), que corresponde a 57.1%. Por outro lado, somente 11 pacientes com ALT normal apresentavam AI graus 2 e 3 (28.9%). Dessa forma, os pacientes com ALT elevada, apresentam um risco de 3.27 vezes maior de apresentar atividade inflamatória grave em comparação com aqueles com ALT normal ( $p=0,017$ ).

A presença de agregado linfóide na biópsia hepática também apresentou correlação positiva com atividade inflamatória mais intensa. Metavir graus 2 e 3 foram detectadas em 66.7% (12/18) dos pacientes com agregado linfóide na biópsia, em comparação com 34.5% (19/55) daqueles que não apresentavam esse marcador tecidual de infecção crônica pelo VHC. Assim, a presença de agregado linfóide acarretou um risco de 3.78 (IC 95%: 1.228 -11.691) para a presença de atividade inflamatória grave com  $p=0,020$ .

Por outro lado, os pacientes em hemodiálise apresentaram significativamente menos atividade inflamatória grave, comparada aos pacientes com função renal normal. Somente nove de 36 (36%) pacientes em hemodiálise apresentaram atividade inflamatória graus 2 e 3, em comparação com 22 de 37 daqueles com função renal normal. Assim, os paciente em he-

modiálise apresentaram um risco quatro vezes menor de desenvolver atividade inflamatória graus 2 e 3 (OR: 0.227; IC95%: 0.084-0.618), quando comparados aos pacientes com função renal normal.

Tabela 12: Análise univariada dos fatores de risco associados à atividade inflamatória grave (Metavir - graus 2 e 3) em todos os pacientes

Variáveis	Inflamação / Todos os Pacientes (% ou Média ± DP inflamação x Média ± DP Não-inflamação)	OR (95%CI)	p-valor
Idade (anos)	31/73(43.29 ± 11.68 x 40.02 ± 10.23)		0.208
Sexo: Mas / Fem	20/45 (44.4%) / 11/28 (39.3%)		0.665
Tempo de infecção (anos)	31/73 (11.71 ± 3.63 x 12.95 ± 3.81)	0.167	
Hemodiálise: Sim / Não	9/36 (25%) / 22/37 (59.5%)	0.227 (0.084-0.618)	0.004
IMC: ≥ 25 / < 25	9/17 (52.9%) / 22/56 (39.3%)		0.321
DM: Sim / Não	3/9 (33.3%) / 28/64 (43.8%)		0.556
Genótipo: 1 / Não-1	20/55 (36.4%) / 11/18 (61.1%)		0.070
Esteatose: Sim / Não	14/27 (51.9%) / 17/46 (37%)		0.216
Agregado linfóide: Sim / Não	12/18 (66.7%) / 19/55 (34.5%)	3.789 (1.228-11.691)	0.020
Lesão de ducto biliar: Sim / Não	4/5 (80%) / 27/68 (39.7%)		0.999
Pearls (grau 2-4): Sim / Não	3/15 (20%) / 28/58 (48.3%)		0.059
<i>Carga viral (UI/ml)</i>			
≥ 400 000 / < 400 000	14/28 (50%) / 14/39 (35.9%)		0.250
ALT (U/l): ≥ 40 / <40	20/35 (57.1%) / 11/38 (28.9%)	3.273 (1.241-8.628)	0.017
Plaquetas: ≥ 130 000 / < 130 000	2/2 (100%) / 29/71 (40.8%)		0.999
Albumina (g/dl): ≥ 3.5 / < 3.5	3/9 (33.3%) / 28/64 (43.8%)		0.556
Sat transferrina (%): ≥ 50 / < 50	22/45 (48.9%) / 9/28 (32.1%)		0.162

OR – *odds ratio*; DP = desvio-padrão; IC – intervalo de confiança; IMC = índice de massa corporal; DM = diabetes mellitus; ALT = alanina aminotransferase.

Na Tabela 13 está descrita a análise multivariada com os três fatores que apresentaram correlação na análise univariada. Foi constatado que a hemodiálise é fator de proteção para a ocorrência de atividade inflamatória grave, pois os pacientes com função renal normal apresentam significativamente maior inflamação tecidual, comparado aos pacientes em hemodiálise.

Tabela 13: Análise multivariada dos fatores associados à atividade inflamatória grave (Metavir - graus 2 e 3) em todos os pacientes

<b>Variáveis</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p-valor</b>
Hemodiálise	0.227 (0.084-0.618)	0.004
Agregado linfóide		0.213
ALT		0.679

OR = *odds ratio* e IC = intervalo de confiança.

Considerando que o fator de risco para o desenvolvimento de fibrose é a presença de atividade inflamatória e que a hemodiálise reduz o risco de inflamação, podemos afirmar que os pacientes portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise estão protegidos da ocorrência de fibrose.

A terceira etapa do estudo foi avaliar a taxa de progressão da fibrose nos pacientes em hemodiálise. Para isso, nos pacientes infectados pelo VHC e que permaneciam em lista de transplante renal foi realizada uma segunda biópsia. Nove pacientes, que corresponde a 25% daqueles em hemodiálise, submeteram-se à nova biópsia hepática. O tempo médio decorrido entre a realização das duas biópsias foi de 52 meses (40 – 81). Foi observado progressão da fibrose em um ponto em 33% (03/09) dos pacientes, com índice de progressão médio de 0,026. Não houve diferenças no grau de infiltrado inflamatório nos diversos segmentos do lóbulo hepático. Da mesma forma, não houve diferença nos outros aspectos histológicos, como na presença de esteatose, acúmulo linfóide, lesão de ducto biliar e depósito de ferro tecidual.

A análise comparativa do grupo de pacientes que apresentou progressão comparada com aqueles que permaneceram com o mesmo grau de fibrose mostrou não haver diferenças quanto a dados como sexo, idade, tempo de infecção, tempo de hemodiálise, presença de diabetes mellitus. Da mesma forma, não houve diferença quanto aos dados laboratoriais (ALT, albumina, plaquetas, proteína, saturação de transferrina), virológicos (carga viral e

genótipo) e histológicos na primeira biópsia.

## 5 Discussão

Após a descoberta do vírus da hepatite C, em 1989, verificou-se que a taxa de prevalência de hepatite C em pacientes portadores de insuficiência renal crônica era elevada, independente da região e da situação econômica e social do país. Além disso, a taxa de prevalência de VHC nas unidades de hemodiálise apresentava-se muito superior à observada na população em geral. Como exemplo, em 1997, a prevalência na população da Bélgica, da Itália e da França era respectivamente de 0,9%, 0,5% e 1,1%; enquanto que nas unidades de hemodiálise destes países era respectivamente de 9,4%, 22,5% e 16,3%; ou seja, valores até 20 vezes superiores.

O melhor conhecimento das formas de transmissão do VHC e a implementação de precauções para evitar a transmissão de patógenos propiciaram a redução na taxa de incidência nas unidades de hemodiálise em muitos países. Em outros, no entanto, a taxa de incidência permanece estável e elevada, devido à transmissão nosocomial do VHC que ocorre dentro das unidades de hemodiálise, sendo essa atualmente a principal forma de contaminação dos pacientes urêmicos.

Estudo realizado por Okuda *et al.*<sup>150</sup> revelou que a educação dos membros da unidade de hemodiálise e rígida aderência às medidas de controle de transmissão de infecções impediram novos casos de infecção pelo VHC em 730 pacientes em hemodiálise, durante o período de acompanhamento de 01 ano. Este resultado reforça a opinião de alguns autores da não necessidade de manter os pacientes em salas exclusivas para o controle da transmissão do VHC; diferentemente do que ocorre com o vírus da hepatite B. No entanto, nas unidades onde não havia salas específicas para limpeza dos re-processadores dos pacientes contaminados pelo VHC, houve maior soroconversão devido a novas infecções.<sup>151</sup> Dessa forma, atualmente nas unidades de hemodiálise recomendam-se controle sorológico e sala exclusiva para reprocessamento dos dialisadores dos pacientes portadores do VHC.

A vacinação sistemática contra o vírus da hepatite B e o isolamento dos pacientes infectados por esse vírus propiciaram o controle dessa infecção nos pacientes em hemodiálise. Desde então, a hepatite C tornou-se a causa mais comum de doença hepática crônica nos pacientes em hemodiálise e naqueles submetidos ao transplante renal. Além disso, pa-

cientes anti-HCV positivos apresentam maior morbidade e mortalidade durante o período de diálise e após o transplante renal.<sup>29,137</sup>

No presente estudo foram analisados os aspectos clínicos, laboratoriais e histológicos de pacientes infectados pelo vírus da hepatite C, em tratamento regular de hemodiálise e em lista de transplante renal. Também foi realizado um estudo comparativo com pacientes infectados pelo VHC, com função renal normal e pareados em relação a sexo, idade e tempo estimado de infecção. Além disso, em 09 dos 36 pacientes que permaneciam em lista de transplante, foi realizada uma segunda biópsia e verificado a taxa de progressão da fibrose hepática. Este é o primeiro estudo que avalia a progressão da fibrose em pacientes infectados pelo VHC em hemodiálise.

Foram incluídos 36 pacientes em hemodiálise infectados pelo VHC. A maioria era do sexo masculino (61.1%) e a idade média observada foi de 41 anos. O predomínio de homens em pacientes portadores de doença renal crônica em hemodiálise foi observado num estudo epidemiológico em unidades de hemodiálise no Brasil<sup>152</sup> e na população americana em lista de transplante renal.<sup>153</sup> Os adultos do sexo masculino com função renal normal também apresentaram maior taxa de prevalência de hepatite C no inquérito nacional sobre hepatite C realizado na população americana, no período de 1988 a 1994.<sup>154</sup> No entanto, não existem evidências de que o sexo masculino seja mais susceptível para a aquisição do VHC, seja em pacientes com função renal normal ou em urêmicos. Após o efetivo controle da transmissão do VHC por transfusão de sangue, a maior fonte de contaminação nos países desenvolvidos é o uso de drogas injetáveis que é igualmente mais comum em homens. Assim, o predomínio dessa infecção nos homens se deve muito provavelmente a diversas razões comportamentais.

O tempo estimado de infecção observado no presente estudo (12,31 anos) foi maior que o tempo médio de hemodiálise (08 anos). Esses dados revelam que alguns pacientes adquiriram a infecção antes do início da terapia substitutiva renal. De fato, no grupo em hemodiálise nessa pesquisa, 22 pacientes relatavam história de transfusão de sangue, sendo que em 36% (08/22) a transfusão ocorreu antes de 1994, ano de início da realização de teste sorológico (anti-HVC) no Hemocentro de Brasília. Além disso, 13 pacientes relatavam a realização de transplante renal, sendo que em 06 o procedimento foi realizado antes de 1994. Investigação epidemiológica realizada em 761 pacientes portadores de IRC em hemodiálise

no Distrito Federal revelou uma taxa de prevalência de anti-HCV de 13%.<sup>155</sup> Foram observados três fatores de risco relacionados com a aquisição do VHC: tempo de hemodiálise, transfusão de sangue antes de 1994 e a realização de transplante renal antes dessa data. Após o efetivo controle da transmissão do VHC nas transfusões de sangue, o tempo de hemodiálise foi o fator de risco mais importante para a transmissão desse vírus. Esse achado, reconhecido em praticamente todos os trabalhos de prevalência realizados com pacientes em terapia de diálise,<sup>6,93,140</sup> foi semelhante ao observado no estudo realizado no Distrito Federal. Essa constatação sugeriu a existência de fatores relacionados com a transmissão do vírus dentro das unidades de hemodiálise. Posteriormente, houve a comprovação de transmissão do vírus entre pacientes dentro das unidades e a identificação dos fatores relacionados com a transmissão nosocomial que ocorre basicamente por não seguimento das normas básicas de prevenção de infecção hospitalar.<sup>102</sup>

Elevação ocasional de ALT é observada nos pacientes com IRC em hemodiálise, numa freqüência que varia de 10% a 44%. As causas dessa elevação devem ser decorrentes de freqüentes co-morbidades, como infecções virais, infecções bacterianas causando hepatite reacional, associação com patologias de outros órgãos, como o coração, com comprometimento hepático e do uso freqüente de inúmeras medicações, com risco de promover hepatotoxicidade.<sup>156</sup>

Os pacientes portadores de insuficiência renal apresentam níveis inferiores de ALT, quando comparados aos de função renal normal.<sup>157</sup> As possíveis explicações são: redução da vitamina B6 (piridoxina-5'-fosfatase), uma coenzima da alanina aminotransferase; a presença de substâncias em função da uremia que interfere na absorbância de luz ultravioleta, método utilizado para dosagem da ALT; diminuição da síntese de ALT ou inibição da liberação de ALT pelos hepatócitos.<sup>156</sup>

No atual estudo, 04 pacientes (11.1%) apresentaram elevação dos níveis de ALT. Na literatura, a proporção de pacientes urêmicos com ALT elevada é ampla, variando de 4 a 79%.<sup>22,140-143,147,157,158</sup> Essa grande variação pode ser atribuída ao critério de seleção dos pacientes. Alguns autores trabalharam com pacientes com viremia positiva, enquanto para outros, o critério de inclusão foi sorológico. Da mesma forma, alguns trabalhos foram realizados com pacientes urêmicos em hemodiálise, enquanto em outros estudos foram

incluídos pacientes em lista de transplante renal. Os pacientes em lista são reconhecidos como um grupo com melhor estado nutricional, mais adaptado ao programa de hemodiálise e são, de certa forma, selecionados. O presente estudo foi realizado com pacientes que estavam em avaliação para o ingresso em lista de transplante renal, sendo encaminhados ao ambulatório de hepatologia por apresentar anti-HCV positivo, independente dos níveis de ALT. Além disso, só foram incluídos no estudo os pacientes com pesquisa viral positiva.

Não se observou no presente estudo associação entre os níveis de ALT e grau de fibrose ou de atividade inflamatória, achado semelhante à maioria dos estudos realizados com população. Esse achado demonstra que a enzima hepática não é um bom marcador de atividade inflamatória ou de fibrose hepática.<sup>21,22,141-143</sup>

Diante da dificuldade no diagnóstico, no acompanhamento e na verificação do grau de doença hepática causada pelo VHC nos pacientes em hemodiálise e dos níveis inferiores de ALT observado nesse grupo, alguns autores sugeriram que para melhorar a sensibilidade da enzima fosse adotado valor enzimático reduzido, como, por exemplo, metade do valor de referência.<sup>33,158</sup> De qualquer forma, nos pacientes com IRC, a elevação de ALT, quando presente, apresenta uma sensibilidade e especificidade de 83% e 90%, respectivamente, mas com valor preditivo positivo muito baixo (4%) no diagnóstico da hepatite aguda C.<sup>159</sup>

A história natural da hepatite C nos pacientes em hemodiálise não é conhecida e é muito difícil de ser avaliada. Primeiro, porque os níveis de ALT são frequentemente normais e parece não refletir adequadamente a atividade da doença hepática quando comparada com pacientes sem doença renal.<sup>157</sup> Segundo, porque a hepatite C apresenta uma história natural insidiosa e prolongada e os pacientes portadores de doença renal apresentam elevadas taxas de morbidade e mortalidade.<sup>160</sup> Com isso, as conseqüências da doença viral podem não ocorrer ou serem mascaradas. A taxa de progressão de fibrose é o melhor preditor da ocorrência de formas graves de doença hepática. Portanto, as duas melhores formas de avaliar a evolução da hepatite C é verificar a taxa de mortalidade e o grau de fibrose hepática.

A presença de cirrose hepática é um evento pouco comum em pacientes sob hemodiálise. Estudo ítalo-americano com renais crônicos, reunindo 4196 pacientes, constatou cirrose hepática em somente 2% dos americanos e 1,5% dos italianos. Porém, quando pre-

sente, a cirrose acarreta uma taxa de mortalidade 35% superior, comparada aos pacientes sem doença hepática.<sup>161</sup> Também, o câncer de fígado foi mais freqüente nessa população e estava relacionado com a grande prevalência dos vírus B e C.<sup>162</sup>

Espinosa *et al.*<sup>32</sup> observaram, num tempo médio de 10 anos, que 17,5% dos pacientes urêmicos infectados pelo VHC evoluíram para cirrose hepática, e vários autores demonstraram que a taxa de mortalidade nos pacientes portadores do VHC em hemodiálise era maior que os pacientes não infectados.<sup>32,132-134</sup> Além disso, metanálise incluindo estudos acima citados demonstrou que o risco de óbito nos pacientes VHC positivo em hemodiálise foi de 1,75 (IC95% 1,3 – 1,86) quando comparado aos pacientes com anti-HCV negativo.<sup>163</sup> Embora o risco de óbito seja pequeno, esses dados demonstram que os pacientes infectados pelo VHC apresentam maior chance de morrer quando comparados com os não infectados. Como causa de óbito, a doença hepática, o hepatocarcinoma e a infecção bacteriana foram mais freqüentes no grupo de pacientes com anti-HCV positivo. No entanto, Bloom *et al.*<sup>135</sup> verificaram que a causa de óbito mais comum nos pacientes infectados pelo VHC, em lista de transplante renal, era doença cardiovascular, e o diabetes mellitus foi o único fator de risco relacionado com esse desfecho.

Outro aspecto importante verificado foi que a taxa de mortalidade nos pacientes anti-HCV positivos, mantidos em hemodiálise, era maior quando comparado àqueles infectados submetidos ao transplante renal.<sup>132,135,136</sup> Essa observação demonstrou que o transplante renal pode se constituir numa opção adequada para esses pacientes.

Análise comparativa da taxa de mortalidade após o transplante renal, entre pacientes infectados pelo VHC com aqueles não infectados, mostra resultados controversos. Nenhum impacto na mortalidade e na sobrevida do enxerto foi demonstrado até o quinto ano após o procedimento. Após esse período, alguns autores detectaram redução na sobrevida do paciente e do enxerto.<sup>164-166</sup> Metanálise confirmou a maior mortalidade e perda do enxerto nos pacientes infectados com o VHC, sendo esses riscos estimados em 1,79 (IC95% 1,57-2,03) e 1,56 (IC95%, 1,35-1,80), respectivamente.<sup>137</sup> No entanto, a maior mortalidade nos receptores de transplante renal com anti-HCV positivo não foi confirmada por outros autores.<sup>167-169</sup> Esses dados contraditórios refletem muito provavelmente erros de amostragem, com diferentes locais de estudo e pacientes com graus variados de doença no momento do transplante.

As causas da maior mortalidade nos pacientes infectados pelo VHC e submetidos ao transplante renal ainda não estão completamente definidas. Estudos iniciais sugeriram que a doença hepática descompensada seria a responsável pela maior taxa de mortalidade nos receptores de transplante renal anti-HCV positivos.<sup>32,156</sup> Entretanto, nesses estudos, em pelo menos numa parte dos pacientes o diagnóstico de hepatite se deu retrospectivamente e após a realização do transplante. Dessa forma, pode ter ocorrido o não reconhecimento de doença hepática avançada no momento do transplante, sendo essa a razão pela alta taxa de descompensação observada nessa população. Rao *et al.*<sup>138</sup> realizaram biópsia antes do transplante renal e demonstraram pior evolução nos pacientes com fibrose hepática mais intensa. A presença de alterações nas funções hepáticas no período pré-transplante renal influenciou na taxa de mortalidade pós-transplante.<sup>170</sup> Assim, a realização da biópsia hepática antes do transplante renal permanece como arma valiosa na avaliação desse grupo de pacientes.

A menor sobrevivência dos pacientes com anti-HCV positivos submetidos ao transplante renal pode não ser decorrente da doença hepática e sim de outros fatores que podem estar relacionados com o próprio vírus da hepatite C ou outras comorbidades. Estudos têm revelado uma associação muito grande entre diabetes no período pós-transplante e VHC, podendo justificar a maior morbidade e maior mortalidade.<sup>171</sup>

Outro aspecto avaliado e ainda sem definição dos fatores envolvidos é a taxa de progressão da fibrose hepática nos pacientes infectados pelo VHC submetidos ao transplante renal. Recentemente, Alric *et al.*<sup>172</sup> relataram que após o TX renal havia uma lenta progressão da fibrose hepática. Kamar *et al.*<sup>173</sup> descreveram que a progressão da fibrose está relacionada com o estágio inicial de fibrose e com a alta taxa de diversificação do genoma viral da região hipervariável do segmento E2 do vírus da hepatite C. Além disso, observaram que alguns pacientes apresentaram regressão da fibrose após o transplante renal.

No presente estudo não foi avaliada taxa de mortalidade de pacientes submetidos a hemodiálise, mas a avaliação histológica é ainda considerada um exame de padrão ouro para avaliar o estágio de fibrose no fígado e prever a evolução da doença naqueles submetidos ao transplante renal.

A primeira classificação de hepatite crônica era dividida em persistente e ativa. Hepatite crônica persistente apresentava um curso benigno e se caracterizava por inflamação restrita ao espaço-porta e discreta alteração parenquimatosa, enquanto que na forma crônica ativa havia a presença de hepatite de interface com maior risco de evoluir para a cirrose hepática. Posteriormente, surgiram várias classificações de hepatite crônica. Todas utilizam um sistema de escores e avaliam a intensidade da atividade necroinflamatória e a alteração estrutural, ou seja, o estágio de fibrose que no grau máximo configura a cirrose. Três são os mais utilizados: Knodell,<sup>174</sup> Ishak<sup>175</sup> e Metavir.<sup>148</sup>

No sistema de escores de Knodell *et al.*,<sup>174</sup> a atividade necroinflamatória varia de 0 a 18 pontos, sendo que a inflamação e necrose periportal varia de 0 a 10, a inflamação e necrose lobular de 0 a 4 e a inflamação portal de 0 a 4. O estágio de fibrose é graduado em 0 como ausência de fibrose, 1 como fibrose portal, 3 quando existir fibrose em ponte e 4 quando a cirrose está estabelecida. A escala de fibrose descontínua foi idealizada com o objetivo de separar a fibrose leve da fibrose acentuada e cirrose. Esse sistema, embora seja amplamente utilizado, não apresenta uma boa reprodutibilidade intra e interobservador; além do que, a ausência de um estágio no sistema de escores dificulta a avaliação estatística.<sup>176</sup>

A classificação de Ishak *et al.*<sup>175</sup> foi proposta como uma modificação da classificação anterior e utiliza uma escala de 0 a 6 para a fibrose hepática. Os escores 1 e 2 indicam fibrose restrita ao espaço-portal, 2 e 3 presença de fibrose em ponte, 5 como cirrose incompleta e 6 quando a cirrose está estabelecida. A escala de inflamação é semelhante à de Knodell. Embora a classificação de Ishak discrimine melhor os diferentes estágios de fibrose, é menos utilizada e a variação intra e interobservador não foi adequadamente avaliada.<sup>176</sup>

O sistema Metavir<sup>148</sup> foi proposto por um grupo de patologistas franceses, sendo as alterações necroinflamatórias graduadas de 0 a 3 e as de fibrose de 0 a 4. O escore de atividade inflamatória (AI) é uma associação da inflamação nos segmentos peri portal e lobular do fígado. Essa classificação é bastante simples, facilmente empregada na rotina diagnóstica, embora falha na ausência de avaliação do infiltrado inflamatório do espaço-porta. No entanto, é bastante utilizada em estudos clínicos patológicos, apresenta excelente reprodutibilidade, principalmente em relação ao estágio de fibrose e foi a escolhida para ser utilizada no presente estudo.<sup>176</sup>

Patologistas brasileiros, no ano de 2000, propuseram uma nova classificação para hepatites crônicas, sendo avaliadas as alterações estruturais, assim como a intensidade e as características do infiltrado inflamatório nos diversos segmentos do lóbulo hepático, ou seja os espaços-portal, periportal e parenquimatoso.<sup>177</sup> Essa classificação, embora bastante adequada e utilizada pelo Ministério da Saúde na liberação de medicamentos para o tratamento das hepatites crônicas B e C, necessita de validação internacional.

A fibrose hepática pode não ser homogênea em todo o fígado e a amostra retirada para a análise pode não refletir adequadamente o grau de fibrose. Para reduzir os erros de amostragem, a quantidade de material retirado do fígado, ou seja, o tamanho da biópsia é fundamental.<sup>178</sup>

Nos pacientes com insuficiência renal crônica a história natural da hepatite C não é conhecida. Da mesma maneira, não são conhecidos os fatores de progressão nesse grupo de pacientes e se os mesmos fatores que interferem com os pacientes com função renal normal também influenciam naqueles em hemodiálise. Aquisição do VHC com idade superior a 40 anos, o sexo masculino, o uso abusivo de álcool, a obesidade e a coinfeção com o vírus da hepatite B e HIV são fatores conhecidos que aceleram a progressão da fibrose hepática nos pacientes com função renal normal.<sup>176,179</sup>

Alguns autores observaram que, nos pacientes em hemodiálise e infectados pelo VHC, a evolução para cirrose hepática poderia ocorrer num período de tempo relativamente muito curto, em torno de 10 anos, quando comparado aos pacientes urêmicos e não infectados.<sup>124,180</sup> Por outro lado, Perez *et al.*<sup>181</sup> compararam pacientes infectados pelo VHC em hemodiálise e após a realização do transplante renal, pareados em sexo, idade de contaminação e tempo de infecção. Observaram que após o transplante havia maior grau de fibrose e de necrose em ponte e sugeriu que a hemodiálise poderia atuar como fator protetor, reduzindo a taxa de progressão da doença hepática.

No presente estudo, 19/36 (52,8%) dos pacientes em hemodiálise não apresentaram nenhuma alteração estrutural na biópsia hepática. Quando presente, a fibrose hepática foi discreta (Metavir graus 1 e 2) em 41,7% (15/36) dos urêmicos e somente 02 pacientes (5,5%) apresentaram fibrose em ponte. Além disso, nenhum (0%) apresentou fibrose grau

4 (cirrose hepática). Esses resultados são concordantes com aqueles descritos na literatura, embora exista uma grande variação no grau de alteração estrutural hepática em pacientes renais crônicos. Os trabalhos utilizaram diferentes classificações dificultando a comparação dos resultados. Mesmo assim, verifica-se na literatura que o percentual de pacientes com alterações histológicas hepáticas mínimas na biópsia variou de 14 a 42% e de fibrose em ponte foi de 3 a 11%. A taxa de cirrose hepática observada nos diferentes estudos foi de 0 a 24%.<sup>22,139-144,146,147</sup>

As diferenças nos resultados desses estudos podem ser atribuídas às características dos pacientes analisados. Alguns estudos incluíram pacientes com insuficiência renal tratados conservadoramente, enquanto outros avaliaram pacientes em hemodiálise ou em diálise peritoneal. Além disso, alguns estudos relataram as alterações de pacientes em lista de transplante. Outro aspecto importante é que a maioria dos estudos descreve as alterações da biópsia hepática sem mencionar o tempo de infecção, a idade de aquisição e o uso de imunossuppressores, fatores que interferem na progressão da doença nos pacientes com função renal normal e que podem também ter importância no portador de insuficiência renal.

Nesse estudo não se encontrou relação do estágio de fibrose hepática com fatores como a idade; o sexo; o índice de massa muscular; a idade de aquisição da doença; o tempo de infecção; níveis de plaquetas, albumina e saturação de transferrina e outros aspectos da histologia hepática como a presença de esteatose, de lesão de ducto biliar e de folículos linfóides na biópsia hepática dos pacientes em hemodiálise. Esses achados são semelhantes ao observados por outros autores.<sup>22,139,143,146</sup> A ausência de marcadores não invasivos de fibrose hepática reforça a biópsia como importante método de avaliação do estágio de doença nos pacientes infectados pelo VHC em lista de transplante renal.

Atividade inflamatória grave, definida no sistema Metavir como graus 2/3 e que se caracteriza pela presença de hepatite de interface, foi detectada em 27,7% (10/36) dos pacientes no presente estudo. Embora os trabalhos publicados na literatura avaliando grau de atividade inflamatória utilizaram classificações diferentes foi possível estabelecer algumas comparações. O grau de inflamação hepática nos pacientes em hemodiálise foi relatado como sendo discreta a moderada na maioria dos estudos.<sup>139-141,143,144,146,147,182</sup> Barril *et al.*<sup>140</sup> descreveram as alterações histológicas de 218 biópsias hepáticas de pacientes renais crônicos

de vários centros da Espanha. Fígado normal foi observado em 4,58%; hepatite crônica persistente em 23,4%; hepatite crônica ativa em 35,3% e cirrose em 14,67%. Martim *et al.*<sup>146</sup> ao analisar 25 pacientes portadores de IRC em hemodiálise, encontraram alterações inflamatórias compatíveis com hepatite de interface na maioria dos casos (76%), com necrose focal leve em 54% e moderada em 34%. Atividade inflamatória grave ou hepatite de interface grave não foi observada.

No presente estudo não foi verificada relação de grau de inflamação com tempo de hemodiálise, mas Sezer *et al.*<sup>139</sup> observaram que quanto maior o tempo de hemodiálise menor era o grau de processo inflamatório hepático. Esse autor detectou associação entre a elevação de ALT e o grau de atividade inflamatória - quanto maior o grau de atividade inflamatória portal, maiores os níveis de ALT. Além disso, os níveis das enzimas hepáticas correlacionavam-se negativamente com o tempo de hemodiálise. Esses dados sugerem que o tempo de hemodiálise atua como fator redutor de processo inflamatório intra-hepático.

O sistema Metavir<sup>148</sup> não avalia grau de atividade inflamatória no espaço-porta. Outras classificações, como a da Sociedade Brasileira de Hepatologia,<sup>177</sup> atribui importância no grau de inflamação nesse segmento do lóbulo hepático. Sendo assim, fizemos uma análise no grau de inflamação nos pacientes em HD infectados pelo VHC. Verificamos inflamação portal na grande maioria dos pacientes, sendo em geral de grau discreto, pois 83,2% pacientes apresentavam graus 1 e 2 e somente um paciente (2,7%) tinha grau acentuado de inflamação nesse segmento do lóbulo hepático (3). Não houve associação entre elevação de ALT e o grau de atividade inflamatória portal.

Um estudo brasileiro, realizado em São Paulo, com 73 pacientes em hemodiálise observou fígado normal em 1%, alterações reacionais em 27%, hepatite crônica lobular em 3%, hepatite crônica sem atividade necroinflamatória periportal em 27% e hepatite crônica com atividade necroinflamatória periportal em 67% deles.<sup>182</sup> O grau de inflamação portal também foi avaliado e constatado que atividade inflamatória grau 1 estava presente em 37%; grau 2 em 52%; grau 3 em 10%. Somente um paciente não apresentava inflamação no espaço-porta e nenhum paciente apresentou grau 4 de inflamação.

No atual estudo, a taxa de prevalência dos marcadores histológicos da hepatite

C foi de 16,3% (6/36) para esteatose, 5,5% (2/36) para agregado linfóide e 2,5% (1/36) de lesão de ducto biliar. A presença de marcadores de hepatite C observada nesse estudo foi semelhante aos achados nos estudos com pacientes com insuficiência renal crônica. Iotti *et al.*<sup>183</sup> descreveram a presença de foliculo linfóide em 29% (6/21) das biópsias analisadas, enquanto que a lesão de ducto biliar e esteatose foram vistas em 33% (7/21). Hu *et al.*<sup>145</sup> encontraram esteatose em 31,1% dos pacientes, sendo a grande maioria em grau discreto. Ferreira *et al.*<sup>182</sup> encontraram agregado linfóide em 25% (18/73), de lesão de ducto biliar em 10% (7/73) e de esteatose em 13% (10/73) dos pacientes analisados. Aklopat *et al.*<sup>184</sup> observaram lesão de ducto biliar em 44% e de agregado linfóide em 22% (2/9). A presença de marcadores histológicos do VHC parece ser menor nos pacientes com IRC que as observadas nos pacientes com função renal normal.

Outro aspecto avaliado na atual pesquisa foi o depósito de ferro no tecido hepático pela técnica de Pearls que foi detectado em 61,1% (22/36) dos pacientes renais crônicos em hemodiálise, sendo que siderose acentuada (Pearls graus 2-4) foi observada em 33,3% (12/36). Esse achado foi compatível com os descritos na literatura em pacientes renais crônicos infectados pelo VHC. Martin *et al.*<sup>146</sup> detectaram ferro no tecido hepático em quantidade discreta e moderada em 62% (23/37) dos pacientes, presente tanto nas células de Kupffer como nos hepatócitos. Iotti *et al.*<sup>183</sup> e Aklopat *et al.*<sup>184</sup> também descreveram presença de ferro no tecido hepático, numa proporção importante de pacientes renais crônicos em hemodiálise, sendo respectivamente de 44% a 76%.

Outra etapa desse estudo foi verificar a influência da hemodiálise na doença hepática causada pelo VHC. Para isso, foi realizada uma análise comparativa dos pacientes urêmicos em HD, infectados com o VHC, com pacientes infectados pelo mesmo vírus e portadores de função renal normal. Considerando que o sexo, a idade e o tempo de infecção são fatores que influenciam a evolução da hepatite C, foi feito o controle dessas variáveis. No banco de dados de hepatite crônica causada pelo VHC do ambulatório de gastroenterologia do Hospital de Base do DF que possui 548 pacientes catalogados foi obtido um grupo com a faixa de idade, a idade de contaminação e o tempo de infecção semelhantes aos pacientes em hemodiálise. O pareamento dessas variáveis se deu num período de mais ou menos 03 anos.

A análise comparativa dos pacientes em hemodiálise com os pacientes infectados com o VHC e com função renal normal revelou que aqueles em hemodiálise apresentaram menor IMC ( $p < 0,001$ ), menores níveis de ALT ( $p < 0,001$ ), de albumina ( $p < 0,001$ ), de proteína total ( $p < 0,001$ ) e menor carga viral ( $p = 0,018$ ) (Tabelas 8 e 9). Referente aos dados histológicos, detectou-se uma menor prevalência de fibrose ( $p = 0,025$ ), de atividade inflamatória ( $p = 0,003$ ), de esteatose ( $p < 0,001$ ), de agregado linfóide ( $p < 0,001$ ) e maior quantidade de ferro no tecido hepático ( $p = 0,008$ ) dos pacientes em hemodiálise quando comparados ao grupo de pacientes com função renal normal.

Considerando que a presença de fibrose é o principal determinante na evolução da doença hepática crônica e para o aparecimento de hipertensão portal, realizamos uma análise dos fatores de risco para o surgimento de fibrose hepática em todos os pacientes. A análise univariada (Tabela 10) mostrou que quatro fatores correlacionavam-se com a presença de fibrose hepática nos dois grupos de pacientes: hemodiálise ( $p = 0,027$ ), atividade inflamatória grave ( $p < 0,001$ ), agregado linfóide ( $p = 0,029$ ) e depósito de ferro tecidual importante ( $p = 0,022$ ). A análise multivariada (Tabela 11) demonstrou que a presença de atividade inflamatória grave na biópsia hepática foi o único fator de risco independente para o desenvolvimento da fibrose hepática ( $RR = 15$ ). Dessa forma, os pacientes com atividade inflamatória grave (Metavir 2 e 3) apresentam um risco 15 vezes maior de apresentar fibrose, quando comparados àqueles com inflamação leve ou ausente (Metavir 0 e 1).

Diante dos dados acima, realizamos a análise dos fatores de risco para a presença de atividade inflamatória grave (Metavir graus 2 e 3). Na análise univariada, a hemodiálise ( $p < 0,004$ ), a presença de agregado linfóide ( $p = 0,020$ ) e a presença de elevação de ALT ( $p = 0,017$ ) se correlacionavam com a presença de atividade inflamatória importante (Metavir 2 e 3) na biópsia hepática. (Tabela 12) Na análise multivariada (Tabela 13) somente a hemodiálise mostrou correlação positiva com a atividade inflamatória ( $p = 0,004$ ). Assim, os pacientes em hemodiálise estão protegidos (risco de proteção de aproximadamente 4x) de apresentarem atividade inflamatória importante. A menor atividade inflamatória atuaria como proteção e diminuiria o risco de fibrose hepática.

Na literatura, encontramos somente 07 trabalhos comparando os dados histológicos de pacientes infectados pelo VHC em hemodiálise e com função renal normal.<sup>22, 143–145, 182, 184, 185</sup>

A casuística do presente estudo (n=36) é adequada, pois o número de pacientes avaliados nos estudos acima citados variou de 09 a 90.

Semelhante ao achados na atual pesquisa, a maioria dos estudos detectou que fibrose hepática foi significativamente menos freqüente e menos intensa nos pacientes em hemodiálise, quando comparada aos pacientes com função renal normal.<sup>143-145,184,185</sup> Outro trabalho também mostrou menos fibrose nos pacientes em hemodiálise sem atingir nível de significância.<sup>182</sup>

Sterling *et al.*<sup>22</sup> avaliaram a biópsia hepática de 50 pacientes em lista de transplante renal. Verificaram que fibrose em ponte ou cirrose estava presente em 22%. Esse achado não foi estatisticamente diferente do grupo de controle composto por pacientes com anti-HCV positivo, com função renal preservada e enzimas hepáticas normais. No entanto, no outro grupo controle, formado por pacientes com função renal normal e ALT alterada, a taxa de fibrose em ponte ou cirrose foi de 49%. Esse achado sugere que os pacientes em hemodiálise se parecem como os pacientes com função renal normal e enzimas hepáticas normais. Nos pacientes com função renal normal e ALT persistentemente normais, a avaliação histológica revela na maioria das vezes alterações discretas, com menor freqüência de fibrose avançada e de cirrose. A progressão de fibrose nesses pacientes, com ALT normal, é pouco freqüente.

Os achados relativo à fibrose hepática e à atividade inflamatória analisados nos pacientes em HD nesse estudo são semelhantes aos observados por outros autores.<sup>22,143-146,182,184,185</sup> Quando comparados com outros grupos de pacientes, os urêmicos em diálise apresentaram estágios de fibrose menos avançada e menor grau de inflamação no fígado. Martin *et al.*<sup>146</sup> compararam pacientes em hemodiálise com portadores de insuficiência renal tratados conservadoramente e observaram que aqueles em diálise apresentavam menores níveis de ALT, menor carga viral, menor atividade necroinflamatória e fibrose. Lemos *et al.*<sup>186</sup> também compararam pacientes portadores de insuficiência renal tratadas por terapia dialítica com aqueles em tratamento conservador. Nesse estudo se constatou que os renais crônicos no período pré-diálise apresentaram maior proporção de elevação de ALT, AST, maior proporção de hepatite de interface e de fibrose. No entanto, esses pacientes apresentavam maior tempo de infecção. Assim, não foi possível concluir se a doença hepática era menos agressiva nos doentes em hemodiálise.

Alric *et al.*<sup>172</sup> compararam três grupos de pacientes: 1) receptores de transplante renal; 2) em hemodiálise; e, 3) aqueles com função renal normal. Os pacientes em hemodiálise apresentaram menor índice de atividade inflamatória (Metavir), menor estágio de fibrose (Metavir) e menor taxa de progressão indireta de fibrose que os pacientes dos dois outros grupos. Perez *et al.*<sup>181</sup> observaram doença hepática mais agressiva em receptores de transplante renal infectados pelo VHC, quando comparados com pacientes infectados e mantidos em hemodiálise.

O motivo da menor inflamação hepática observada em pacientes urêmicos não é conhecido. Uma possível explicação seria o estado imunitário desses pacientes, com disfunção de células B e T que estão presentes no paciente com IRC.<sup>187</sup> No entanto, os pacientes com severa disfunção imunológica como os infectados pelo HIV e coinfectados com o VHC apresentam progressão acelerada da fibrose, menor tempo para o desenvolvimento de cirrose e maior taxa de mortalidade relacionada com doença hepática descompensada.<sup>188</sup> Assim, por que os pacientes renais crônicos teriam doença menos agressiva? Rampino *et al.*<sup>185</sup> demonstraram elevados níveis de fator de crescimento de hepatócitos (HGF) presentes no soro de pacientes infectados pelo VHC em hemodiálise, quando comparados com pacientes com função renal normal também infectados. Além disso, detectaram um menor número de hepatócitos em apoptose. Concluíram ser essa a razão de a hepática ser menos agressiva nos pacientes em diálise. Sezer *et al.*<sup>189</sup> avaliaram o grau de *stress* oxidativo em pacientes portadores de infecção crônica pelo VHC (tempo de doença maior de 01 ano) e sem doença hepática avançada. Observaram que esses pacientes apresentaram níveis séricos de substâncias antioxidantes mais elevados, quando comparados aos pacientes urêmicos não infectados. O VHC pode induzir fibrose hepática diretamente pela ativação das células estelares e indiretamente por promover *stress* oxidativo e apoptose das células infectadas.<sup>190</sup> Além disso, recentemente foi verificada relação entre níveis de quimiocinas e de citocinas, em especial o fator de necrose tumoral e as interleucinas 2 e 8, com o grau de atividade inflamatória e o estágio de fibrose hepática nos pacientes com hepatite C com função renal normal.<sup>191</sup>

Os portadores de insuficiência renal crônica, além de apresentarem as alterações da função imunológica devido à perda da função renal e acúmulo de toxinas urêmicas, podem

durante as sessões de hemodiálise, sofrer alterações no sistema de defesa pela ativação de células mononucleares devido ao contato com a membrana de diálise e com isso promover a síntese e ativação de citocinas.<sup>192</sup> O grau de interferência na relação do vírus da hepatite C com o hospedeiro portador de IRC em hemodiálise ainda não está definido.

Independente das razões, a menor inflamação hepática presente nos pacientes em hemodiálise pode contribuir para retardar a progressão da doença hepática. Fontaine *et al.*<sup>193</sup> ao analisarem a progressão da fibrose hepática nos pacientes infectados pelo VHC demonstraram, na análise multivariada, que o índice de atividade inflamatória foi o único fator de risco (RR 25.5, IC 95% 2.7 – 238, p=0.004) associado com a progressão da doença. Em geral, a reação inflamatória celular no espaço-porta, agredindo a placa limitante, promovendo hepatite de interface e atingindo o lóbulo (necrose lobular) é o mecanismo básico gerador de fibrose nos pacientes com hepatite crônica C. Assim, nos pacientes em hemodiálise, o grau de atividade inflamatório está atenuado. Dessa forma, a menor atividade inflamatória induziria uma menor atividade de fibroblastos e menor fibrose.

Nos dois grupos de pacientes analisados não se identificou nenhum caso de cirrose hepática. Os pacientes incluídos nesse estudo eram jovens, adquiriram a infecção com idade inferior a 40 anos, não apresentavam história de ingestão alcoólica, não eram portadores de coinfeção pelo vírus da hepatite B ou HIV e o tempo médio estimado de infecção era inferior a 15 anos. Nos pacientes com função renal normal, estima-se que a cirrose se desenvolve em 2% a 8% das pessoas que adquiriram a infecção com idade inferior a 40 anos e após tempo de infecção de 20 anos.<sup>179</sup>

Outro fator que pode acelerar o processo de fibrose hepática nos pacientes infectados pelo VHC é o depósito de ferro no fígado.<sup>179</sup> No atual estudo, o depósito de ferro foi mais freqüente e mais intenso nos pacientes em hemodiálise (p=0,008). Este achado está relacionado com as transfusões de sangue e freqüente reposição de ferro oral em renais crônicos. Contudo, não houve qualquer correlação entre a presença de ferro e de fibrose hepática nos pacientes em HD, assim como naqueles com função renal normal.

Poucos estudos fizeram avaliação virológica nos pacientes urêmicos e infectados pelo VHC.<sup>128,143,145,146,194,195</sup> Com exceção de um estudo,<sup>128</sup> os outros observaram que os

pacientes em hemodiálise apresentam menor carga viral, quando comparado aos pacientes com função renal normal. Menor carga viral do VHC nos pacientes em HD pode ser devido à depuração do HCV RNA durante a sessão de hemodiálise, à aderência de partículas virais na membrana de diálise ou liberação de citocinas.<sup>194</sup> Budalamenti *et al.*<sup>195</sup> observaram redução da carga viral durante a sessão de hemodiálise, associada à elevação concomitante dos níveis de alfa interferon e concluíram que esses achados poderiam contribuir para uma doença menos agressiva nos pacientes em diálise.

No presente estudo não houve relação entre os dados virológicos (carga viral e genótipo) com os exames bioquímicos ou com as alterações de histologia hepática como o estágio de fibrose hepática e o grau de atividade inflamatória nos pacientes em hemodiálise. Os estudos publicados na literatura que avaliaram esse aspecto também não detectaram relação entre o genótipo e a carga viral com alterações histológicas na biópsia hepática.<sup>128,143,145,146</sup> Essa ausência de correlação dos dados virológicos com de histologia hepática também foi relatada em pacientes com função renal normal.<sup>179</sup> No entanto, recentemente foi demonstrado que fatores virais podem influenciar a evolução da doença, pois estudos avaliando o seqüenciamento da região hipervariável do VHC (HVR)-1 comprovaram que a progressão da doença hepática em pacientes portadores de VHC submetidos a transplante de rim<sup>173</sup> e de fígado<sup>196</sup> estava relacionada com o grau de diversidade viral.

Encontramos uma distribuição dos genótipos do VHC nos pacientes em hemodiálise semelhante ao grupo de pacientes com função renal normal. Esse achado foi o mesmo encontrado num estudo realizado por Azevedo *et al.* no Rio de Janeiro.<sup>128</sup> No entanto, Perez *et al.*<sup>197</sup> encontraram uma distribuição de genótipos no grupo de pacientes em hemodiálise e após o transplante renal diferente da população em geral e atribuíram essa diferença a potenciais fatores epidemiológicos, virais ou do próprio hospedeiro.

Observamos que os pacientes em hemodiálise apresentaram níveis de aminotransferase significativamente menores que os pacientes com função renal normal, achado semelhante à de outros autores.<sup>128,139,143</sup> Na análise univariada, os pacientes com ALT elevada apresentaram mais frequentemente atividade inflamatória grave ( $p=0,017$ ), embora isso não se tenha mantido na análise multivariada ( $p=0,679$ ). Também não foi verificada correlação de elevação de ALT com fibrose ( $p=0,167$ ), significando que os níveis enzimáticos não predizem

o grau e o estágio de alterações histológicas nos pacientes em hemodiálise.

Nos pacientes com função renal normal, a infecção pelo VHC é caracterizada pela lenta progressão da fibrose hepática, com uma taxa média de progressão de fibrose de aproximadamente 0,10 – 0,15 unidades/ano, sendo que numa parcela desses pacientes a fibrose não progride, enquanto em outros a cirrose se desenvolve rapidamente. Alguns fatores independentes como idade de aquisição da doença, o uso de álcool e o sexo masculino interferem na taxa de progressão da fibrose.<sup>198</sup> Estudos prospectivos com avaliação histológica seqüencial revelaram que outros fatores como a atividade necroinflamatória, a resistência à insulina e o polimorfismo genético também influenciam na progressão da fibrose hepática nos pacientes infectados pelo VHC.<sup>179</sup>

No presente estudo, uma segunda biópsia foi realizada em 25% (09/36) dos pacientes em hemodiálise, com um tempo médio entre os procedimentos de 4 anos. Foi detectado progressão da doença em 03 (33%) pacientes, com taxa média de 0,15 unidades de fibrose/ano. A análise comparativa dos pacientes que tiveram progressão da doença (n=3) com aqueles que não progrediram não revelou fatores preditores. Embora com pequeno número, esse é o primeiro relato na literatura avaliando a taxa de progressão da fibrose em pacientes sob tratamento de hemodiálise. A proporção de pacientes que apresentou progressão da fibrose é semelhante aos pacientes com função renal normal, e com taxa semelhante à relatada na literatura.<sup>198</sup>

Desde a descoberta do VHC em 1989, passando pela constatação da elevada prevalência mundial e da importância desse vírus como o maior causador de doença hepática crônica, muitos aspectos dessa infecção foram elucidados. Alguns grupos de pacientes, como os usuários de álcool e os imunodeprimidos, como os portadores de HIV, apresentam evolução para a cirrose mais rapidamente.

Dessa forma, seria de esperar que pacientes com insuficiência renal crônica, que também são portadores de deficiências imunológicas, apresentassem evolução mais rápida e mais grave. No entanto, esse trabalho demonstrou que os pacientes em hemodiálise apresentam atividade inflamatória reduzida, menor freqüência de fibrose e menor taxa de progressão de fibrose. Mesmo assim, uma parcela dos pacientes em hemodiálise apresenta

progressão da doença, ainda que seja em menor velocidade. Além disso, não sabemos os fatores que favorecem a progressão da doença nesse grupo de doentes.

A Organização Mundial de Saúde estima que o diagnóstico das pessoas infectadas pelo VHC aumente nos próximos anos. Por outro lado, com a maior expectativa de vida da população em geral, um maior número de pessoas portadoras de doenças crônicas degenerativas necessitarão de tratamento dialítico. Dessa forma, é possível que haja mais pessoas infectadas pelo VHC nas unidades de hemodiálise. Sendo assim, necessitamos de maiores esforços para prevenir infecções dentro das unidades de hemodiálise. Além disso, novos estudos avaliando a taxa de progressão e os fatores que aceleram a evolução da doença hepática para as formas graves como cirrose descompensada e hepatocarcinoma serão importantes para prevenir a ocorrência dessas complicações.

## 6 Conclusões

- Análise comparativa com pacientes infectados pelo VHC, com função renal normal e pareados por sexo, idade e tempo de infecção revela que os pacientes em hemodiálise apresentaram menor IMC ( $p < 0,001$ ), menores níveis de ALT ( $p < 0,001$ ), de albumina ( $p < 0,001$ ), de proteína total ( $p < 0,001$ ), menor carga viral ( $p = 0,018$ ), menor prevalência de fibrose ( $p = 0,025$ ), de atividade inflamatória ( $p = 0,003$ ), de esteatose ( $p < 0,001$ ), de agregado linfóide ( $p < 0,001$ ) e maior quantidade de ferro no tecido hepático ( $p = 0,008$ ).
- Os pacientes portadores de insuficiência renal crônica em tratamento de hemodiálise e infectados pelo VHC apresentam alterações histológicas discretas. Atividade inflamatória grave (Metavir 2 ou 3) foi observada em menos de 27% e fibrose em 47,3%. O grau de fibrose foi em geral discreto e nenhum paciente apresentou cirrose.
- O único fator relacionado com a presença de fibrose nos pacientes em hemodiálise foi a atividade inflamatória grave (Metavir 2 e 3).
- A análise multivariada dos fatores de risco para a fibrose hepática nos pacientes em hemodiálise e nos pacientes com função renal normal demonstrou que a presença de atividade inflamatória grave na biópsia hepática foi o único fator de risco independente para o desenvolvimento da fibrose hepática (RR=15).
- Os pacientes em hemodiálise estão protegidos de apresentar atividade inflamatória grave (Metavir 2 e 3). A presença de menor inflamação reduz o risco de fibrose hepática. A análise multivariada dos fatores de risco revelou que somente a hemodiálise se associou com atividade inflamatória grave ( $p = 0,004$ ).
- Progressão da doença hepática na segunda biópsia ocorreu em 03 (33%) pacientes portadores de IRC em hemodiálise, com taxa média de 0,15 unidades de fibrose/ano. Não foi identificado nenhum fator preditor de progressão da fibrose. A proporção de pacientes que apresentou progressão da fibrose é semelhante aos pacientes com função renal normal relatado na literatura.
- Os resultados desse estudo sugerem que os pacientes em hemodiálise infectados pelo VHC apresentam doença mais discreta comparada aos pacientes com função renal

normal. Mesmo assim, numa parcela desses pacientes parece haver progressão da doença. Novos estudos para identificar os fatores que interferem na relação vírus / hospedeiro no paciente em hemodiálise podem contribuir na condução e tratamento adequado para esse grupo de pacientes.

## Referências Bibliográficas

- [1] Hepatitis c. *Wkly Epidemiol Rec*, 72:65 – 69, 1997.
- [2] Hoofnagle JH. Hepatitis c: the clinical spectrum of disease. *Hepatology*, 26:15S – 20S, 1997.
- [3] Lauer GM and Walker BD. Hepatitis c virus infection. *N Engl J Med*, 345:41 – 52, 2001.
- [4] Heathcote EJ. Antiviral therapy: chronic hepatitis c. *J Viral Hepat*, 14 Suppl 1:82 – 88, 2007.
- [5] Terrault NA and Adey DB. The kidney transplant recipient with hepatitis c infection: pre- and posttransplantation treatment. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2:563 – 575, 2007.
- [6] Fabrizi F, Poordad FF, and Martin P. Hepatitis c infection and the patient with end-stage renal disease. *Hepatology*, 36:3 – 10, 2002.
- [7] Reed KE and Rice CM. Overview of hepatitis c virus genome structure polyprotein processing and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol*, 242:55 – 84, 2000.
- [8] Farci P and Purcell RH. Clinical significance of hepatitis c virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis*, 20:103 – 126, 2000.
- [9] Simmonds P. Variability of hepatitis c virus. *Hepatology*, 21:570 – 583, 1995.
- [10] Oliveira ML, Bastos FI, Sabino RR, and et al. Distribution of hcv genotypes among different exposure categories in brazil. *Braz J Med Biol Res*, 32:279 – 282, 1999.
- [11] Barth H, Cerino R, Arcuri M, Hoffmann M, Schurmann P, Adah MI, Gissler B, Zhao X, Ghisetti V, Lavezzo B, Blum HE, von Weizsacker F, Vitelli A, Scarselli E, and Baumert TF. Scavenger receptor class b type i and hepatitis c virus infection of primary tupaia hepatocytes. *J Virol*, 79:5774 – 5785, 2005.
- [12] Castet V, Fournier C, Soulier A, Brillet R, Coste J, Larrey D, Dhumeaux D, Maurel P, and Pawlotsky JM. Alpha interferon inhibits hepatitis c virus replication in primary human hepatocytes infected in vitro. *J Virol*, 76:8189 – 8199, 2002.

- [13] Wakita T, Pietschmann T, Kato T, and et al. Production of infectious hepatitis c virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*, 11:791 – 796, 2005.
- [14] Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, and Chisari FV. Robust hepatitis c virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U. S. A*, 102:9294 – 9299, 2005.
- [15] Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, and Vitelli A. The human scavenger receptor class b type i is a novel candidate receptor for the hepatitis c virus. *EMBO J*, 21:5017 – 5025, 2002.
- [16] Hsu M, Zhang J, Flint M, and et al. Hepatitis c virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 100:7271 – 7276, 2003.
- [17] Owsianka A, Tarr AW, Juttla VS, and et al. Monoclonal antibody ap33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis c virus e2 envelope glycoprotein. *J Virol*, 79:11095 – 11104, 2005.
- [18] Levy S, Todd SC, and Maecker HT. Cd81 (tapa-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 16:89 – 109, 1998.
- [19] Cormier EG, Tsamis F, Kajumo F, Durso RJ, Gardner JP, and Dragic T. Cd81 is an entry coreceptor for hepatitis c virus. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 101:7270 – 7274, 2004.
- [20] Meola A, Sbardellati A, Bruni EB, and et al. Binding of hepatitis c virus e2 glycoprotein to cd81 does not correlate with species permissiveness to infection. *J Virol*, 74:5933 – 5938, 2000.
- [21] Martin P and Fabrizi F. Treatment of chronic hepatitis c infection in patients with renal failure. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 3:S113 – S117, 2005.
- [22] Sterling RK, Sanyal AJ, Luketic VA, Stravitz RT, King AL, Post AB, Mills AS, Contos MJ, and Shiffman ML. Chronic hepatitis c infection in patients with end stage renal

- disease: characterization of liver histology and viral load in patients awaiting renal transplantation. *Am J Gastroenterol*, 94:3576 – 3582, 1999.
- [23] Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, Kinoshita-Toyoda A, Toida T, Van Kuppevelt TH, Depla E, von Weizsacker F, Blum HE, and Baumert TF. Cellular binding of hepatitis c virus envelope glycoprotein e2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem*, 278:41003 – 41012, 2003.
- [24] Lozach PY, Amara A, Bartosch B, and et al. C-type lectins l-sign and dc-sign capture and transmit infectious hepatitis c virus pseudotype particles. *J Biol Chem*, 279:32035 – 32045, 2004.
- [25] Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, and et al. Claudin-1 is a hepatitis c virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 446:801 – 805, 2007.
- [26] Smith AE and Helenius A. How viruses enter animal cells. *Science*, 304:237 – 242, 2004.
- [27] Rosa D, Saletti G, De Gregorio E, and et al. Activation of naive b lymphocytes via cd81 a pathogenetic mechanism for hepatitis c virus-associated b lymphocyte disorders. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 102:18544 – 18549, 2005.
- [28] Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, Mosca M, Filliponi F, Brunetto RM, Bonino F, Abrignani S, and Valiante NM. Inhibition of natural killer cells through engagement of cd81 by the major hepatitis c virus envelope protein. *J Exp Med*, 195:35 – 41, 2002.
- [29] Fabrizi F, Takkouche B, Lunghi G, Dixit V, Messa P, and Martin P. The impact of hepatitis c virus infection on survival in dialysis patients: meta-analysis of observational studies. *J Viral Hepat*, 14:697 – 703, 2007.
- [30] Nattermann J, Zimmermann H, Iwan A, and et al. Hepatitis c virus e2 and cd81 interaction may be associated with altered trafficking of dendritic cells in chronic hepatitis c. *Hepatology*, 44:945 – 954, 2006.

- [31] Kanto T, Inoue M, Miyatake H, and et al. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize t helper cells in chronic hepatitis c virus infection. *J Infect Dis*, 190:1919 – 1926, 2004.
- [32] Espinosa M, Martin-Malo A, varez de Lara M, and Aljama P. Risk of death and liver cirrhosis in anti-hcv-positive long-term haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 16:1669 – 1674, 2001.
- [33] Espinosa M, Martin-Malo A, and Aljama P. Hepatitis c virus in hemodialysis patients. *Kidney Int*, 58:462 – 463, 2000.
- [34] Witherden DA, Boismenu R, and Havran WL. Cd81 and cd28 costimulate t cells through distinct pathways. *J Immunol*, 165:1902 – 1909, 2000.
- [35] Mazzocca A, Sciammetta SC, Carloni V, and et al. Binding of hepatitis c virus envelope protein e2 to cd81 up-regulates matrix metalloproteinase-2 in human hepatic stellate cells. *J Biol Chem*, 280:11329 – 11339, 2005.
- [36] Nattermann J, Schneiders AM, Leifeld L, and et al. Serum antibodies against the hepatitis c virus e2 protein mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity (adcc). *J Hepatol*, 42:499 – 504, 2005.
- [37] Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, and et al. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis c virus. *Science*, 258:135 – 140, 1992.
- [38] Post JJ, Pan Y, Freeman AJ, and et al. Clearance of hepatitis c viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis c incidence and transmission in prisons study cohort. *J Infect Dis*, 189:1846 – 1855, 2004.
- [39] Farci P, Shimoda A, Coiana A, and et al. The outcome of acute hepatitis c predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*, 288:339 – 344, 2000.
- [40] Farci P, Shimoda A, Wong D, and et al. Prevention of hepatitis c virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 93:15394 – 15399, 1996.

- [41] Logvinoff C, Major ME, Oldach D, and et al. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis c virus infection. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 101:10149 – 10154, 2004.
- [42] Taylor DR, Shi ST, and Lai MM. Hepatitis c virus and interferon resistance. *Microbes Infect*, 2:1743 – 1756, 2000.
- [43] Bigger CB, Brasky KM, and Lanford RE. Dna microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis c virus infection. *J Virol*, 75:7059 – 7066, 2001.
- [44] Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, and Chisari FV. Viral and immunological determinants of hepatitis c virus clearance persistence and disease. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 99:15661 – 15668, 2002.
- [45] Foy E, Li K, Wang C, and et al. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis c virus serine protease. *Science*, 300:1145 – 1148, 2003.
- [46] Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, and Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase pkr by hcv e2 protein. *Science*, 285:107 – 110, 1999.
- [47] Cox AL, Mosbrugger T, Lauer GM, Pardoll D, Thomas DL, and Ray SC. Comprehensive analyses of cd8+ t cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis c. *Hepatology*, 42:104 – 112, 2005.
- [48] Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, and Rehermann B. Impaired effector function of hepatitis c virus-specific cd8+ t cells in chronic hepatitis c virus infection. *J Immunol*, 169:3447 – 3458, 2002.
- [49] Ulsenheimer A, Gerlach JT, Gruener NH, Jung MC, Schirren CA, Schraut W, Zachoval R, Pape GR, and Diepolder HM. Detection of functionally altered hepatitis c virus-specific cd4 t cells in acute and chronic hepatitis c. *Hepatology*, 37:1189 – 1198, 2003.
- [50] Semmo N, Day CL, Ward SM, Lucas M, Harcourt G, Loughry A, and Klenerman P. Preferential loss of il-2-secreting cd4+ t helper cells in chronic hcv infection. *Hepatology*, 41:1019 – 1028, 2005.

- [51] Langhans B, Braunschweiger I, Schweitzer S, and et al. Lipidation of t helper sequences from hepatitis c virus core significantly enhances t-cell activity in vitro. *Immunology*, 102:460 – 465, 2001.
- [52] Cramp ME, Rossol S, Chokshi S, Carucci P, Williams R, and Naoumov NV. Hepatitis c virus-specific t-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis c. *Gastroenterology*, 118:346 – 355, 2000.
- [53] Gale M Jr and Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis c virus. *Nature*, 436:939 – 945, 2005.
- [54] Bowen DG and Walker CM. Mutational escape from cd8+ t cell immunity: Hcv evolution from chimpanzees to man. *J Exp Med*, 201:1709 – 1714, 2005.
- [55] Cox AL, Mosbrugger T, Mao Q, and et al. Cellular immune selection with hepatitis c virus persistence in humans. *J Exp Med*, 201:1741 – 1752, 2005.
- [56] Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, and et al. Recurrence of hepatitis c virus after loss of virus-specific cd4(+) t-cell response in acute hepatitis c. *Gastroenterology*, 117:933 – 941, 1999.
- [57] Day CL, Seth NP, Lucas M, Appel H, Gauthier L, Lauer GM, Robbins GK, Szczepiorkowski ZM, Casson DR, Chung RT, Bell S, Harcourt G, Walker BD, Klenerman P, and Wucherpfennig KW. Ex vivo analysis of human memory cd4 t cells specific for hepatitis c virus using mhc class ii tetramers. *J Clin Invest*, 112:831 – 842, 2003.
- [58] Moskopidid D, Laine E, and Zinkernagel RM. Peripheral clonal deletion of antiviral memory cd8+ t cells. *Eur J Immunol*, 23:3306 – 3311, 1993.
- [59] Lauer GM, Ouchi K, Chung RT, and et al. Comprehensive analysis of cd8(+)-t-cell responses against hepatitis c virus reveals multiple unpredicted specificities. *J Virol*, 76:6104 – 6113, 2002.
- [60] Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A, Abrignani S, Mondelli MU, and Barnaba V. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory

- cd8(+) t cell population in chronic hepatitis c virus infection. *J Clin Invest*, 113:963 – 972, 2004.
- [61] Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, and Nelson DR. An immunomodulatory role for cd4(+)cd25(+) regulatory t lymphocytes in hepatitis c virus infection. *Hepatology*, 40:1062 – 1071, 2004.
- [62] Henderson NC and Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci (Lond)*, 112:265 – 280, 2007.
- [63] Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest*, 117:539 – 548, 2007.
- [64] Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, and Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in nkg2d-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology*, 130:435 – 452, 2006.
- [65] Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, and Iredale JP. Selective depletion of macrophages reveals distinct opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest*, 115:56 – 65, 2005.
- [66] Friedman SL. Stellate cells: a moving target in hepatic fibrogenesis. *Hepatology*, 40:1041 – 1043, 2004.
- [67] Magness ST, Bataller R, Yang L, and Brenner DA. A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations. *Hepatology*, 40:1151 – 1159, 2004.
- [68] Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Ruge M, Wright NA, and Alison MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology*, 126:955 – 963, 2004.
- [69] Gawrieh S, Papouchado BG, Burgart LJ, and et al. Early hepatic stellate cell activation predicts severe hepatitis c recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl*, 11:1207 – 1213, 2005.

- [70] Bataller R and Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*, 115:209 – 218, 2005.
- [71] Canbay A, Friedman S, and Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*, 39:273 – 278, 2004.
- [72] Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, Weber S, Cassan C, Sieling PA, Modlin RL, Liblau RS, Gressner AM, and Kaufmann SH. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating t cell responses. *Immunity*, 26:117 – 129, 2007.
- [73] Kisseleva T and Brenner DA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*, 22 Suppl 1:S73 – S78, 2007.
- [74] Paradis V, Dargere D, Bonvoust F, and et al. Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells. *Lab Invest*, 82:767 – 774, 2002.
- [75] Pinzani M. Pdgf and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci*, 7:d1720 – d1726, 2002.
- [76] Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, and et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med*, 5:226 – 230, 1999.
- [77] Rockey DC, Maher JJ, Jarnagin WR, Gabbiani G, and Friedman SL. Inhibition of rat hepatic lipocyte activation in culture by interferon-gamma. *Hepatology*, 16:776 – 784, 1992.
- [78] Louis H, Van Laethem JL, Wu W, and et al. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration hepatocyte proliferation and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology*, 28:1607 – 1615, 1998.
- [79] Kon K, Ikejima K, Hirose M, and et al. Pioglitazone prevents early-phase hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride. *Biochem Biophys Res Commun*, 291:55 – 61, 2002.
- [80] Han YP. Matrix metalloproteinases the pros and cons in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*, 21 Suppl 3:S88 – S91, 2006.
- [81] Friedman SL, Rockey DC, and Bissell DM. Hepatic fibrosis 2006: report of the third aasld single topic conference. *Hepatology*, 45:242 – 249, 2007.

- [82] Bataller R, Paik YH, Lindquist JN, Lemasters JJ, and Brenner DA. Hepatitis c virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 126:529 – 540, 2004.
- [83] Lai MM. Hepatitis c virus proteins: direct link to hepatic oxidative stress steatosis carcinogenesis and more. *Gastroenterology*, 122:568 – 571, 2002.
- [84] Hellier S, Frodsham AJ, Hennig BJ, and et al. Association of genetic variants of the chemokine receptor ccr5 and its ligands rantes and mcp-2 with outcome of hcv infection. *Hepatology*, 38:1468 – 1476, 2003.
- [85] Knapp S, Hennig BJ, Frodsham AJ, and et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis c virus infection. *Immunogenetics*, 55:362 – 369, 2003.
- [86] Wright M, Goldin R, Hellier S, Knapp S, Frodsham A, Hennig B, Hill A, Apple R, Cheng S, Thomas H, and Thursz M. Factor v leiden polymorphism and the rate of fibrosis development in chronic hepatitis c virus infection. *Gut*, 52:1206 – 1210, 2003.
- [87] Houldsworth A, Metzner M, Rossol S, and et al. Polymorphisms in the il-12b gene and outcome of hcv infection. *J Interferon Cytokine Res*, 25:271 – 276, 2005.
- [88] Huang H, Shiffman ML, Friedman S, and et al. A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis c. *Hepatology*, 46:297 – 306, 2007.
- [89] Mondelli MU, Cerino A, and Cividini A. Acute hepatitis c: diagnosis and management. *J Hepatol*, 42 Suppl:S108 – S114, 2005.
- [90] Seeff LB Hoofnagle JH. National institutes of health consensus development conference: management of hepatitis c: 2002. *Hepatology*, 36:S1 – S2, 2002.
- [91] Chung RT. Acute hepatitis c virus infection. *Clin Infect Dis*, 41 Suppl 1:S14 – S17, 2005.
- [92] Micallef JM, Kaldor JM, and Dore GJ. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis c infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat*, 13:34 – 41, 2006.

- [93] Meyers CM, Seeff LB, Stehman-Breen CO, and Hoofnagle JH. Hepatitis c and renal disease: an update. *Am J Kidney Dis*, 42:631 – 657, 2003.
- [94] Seeff LB, Hollinger FB, Alter HJ, and et al. Long-term mortality and morbidity of transfusion-associated non-a non-b and type c hepatitis: A national heart lung and blood institute collaborative study. *Hepatology*, 33:455 – 463, 2001.
- [95] Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, and et al. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis c virus infection. *Hepatology*, 34:809 – 816, 2001.
- [96] Poynard T, Bedossa P, and Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. the obsvirc metavir clinivir and dosvirc groups. *Lancet*, 349:825 – 832, 1997.
- [97] Simon N, Courouce AM, Lemarrec N, Trepo C, and Ducamp S. A twelve year natural history of hepatitis c virus infection in hemodialyzed patients. *Kidney Int*, 46:504 – 511, 1994.
- [98] Pujol FH, Ponce JG, Lema MG, Capriles F, Devesa M, Sirit F, Salazar M, Vasquez G, Monsalve F, and Blitz-Dorfman L. High incidence of hepatitis c virus infection in hemodialysis patients in units with high prevalence. *J Clin Microbiol*, 34:1633 – 1636, 1996.
- [99] Mizuno M, Higuchi T, Kanmatsuse K, and Esumi M. Genetic and serological evidence for multiple instances of unrecognized transmission of hepatitis c virus in hemodialysis units. *J Clin Microbiol*, 36:2926 – 2931, 1998.
- [100] Furusyo N, Kubo N, Nakashima H, and et al. Confirmation of nosocomial hepatitis c virus infection in a hemodialysis unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 25:584 – 590, 2004.
- [101] Schneeberger PM, Doorenbos CJ, van der V, Bergervoet P, Quint W, and van Doorn LJ. Nosocomial transmission of hepatitis c virus in a dutch dialysis center. *Ned Tijdschr Geneesk*, 143:801 – 806, 1999.

- [102] Fabrizi F, Martin P, Lunghi G, and Ponticelli C. Nosocomial transmission of hepatitis c virus infection in hemodialysis patients: clinical perspectives. *Int J Artif Organs*, 23:805 – 816, 2000.
- [103] Vanderborght BO, Rouzere C, Ginuino CF, Maertens G, Van Heuverswyn H, and Yoshida CF. High prevalence of hepatitis c infection among brazilian hemodialysis patients in rio de janeiro: a one-year follow-up study. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 37 pages = 75 – 79,, 1995.
- [104] Santana GO, Cotrim HP, Mota E, Parana R, Santana NP, and Lyra L. Antibodies to hepatitis c virus in patients undergoing hemodialysis in salvador ba brazil. *Arq Gastroenterol*, 38:24 – 31, 2001.
- [105] Carneiro MA, Martins RM, Teles SA, Silva SA, Lopes CL, Cardoso DD, Vanderborght BO, and Yoshida CF. Hepatitis c prevalence and risk factors in hemodialysis patients in central brazil: a survey by polymerase chain reaction and serological methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96:765 – 769, 2001.
- [106] Busek SU, Baba EH, Tavares Filho HA, Pimenta L, Salomão A, Correa-Oliveira R, and Oliveira GC. Hepatitis c and hepatitis b virus infection in different hemodialysis units in belo horizonte minas gerais brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97:775 – 778, 2002.
- [107] Souza KP, Luz JA, Teles SA, Carneiro MA, Oliveira LA, Gomes AS, Dias MA, Gomes SA, Yoshida CF, and Martins RM. Hepatitis b and c in the hemodialysis unit of tocantins brazil: serological and molecular profiles. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98:599 – 603, 2003.
- [108] Moreira R, Pinho JR, Fares J, and et al. Prospective study of hepatitis c virus infection in hemodialysis patients by monthly analysis of hcv rna and antibodies. *Can J Microbiol*, 49:503 – 507, 2003.
- [109] Mello LA, de Melo-Junior MR, de Albuquerque AC, and Coelho MR. Hepatitis c serum prevalence in hemodialyzed patients. *Rev Soc Bras Med Trop*, 40:290 – 294, 2007.
- [110] Albuquerque AC, Coelho MR, Lopes EP, Lemos MF, and Moreira RC. Prevalence and risk factors of hepatitis c virus infection in hemodialysis patients from one center in recife brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100:467 – 470, 2005.

- [111] Silva LK, Silva MB, Rodart IF, Lopes GB, Costa FQ, Melo ME, Gusmao E, and Reis MG. Prevalence of hepatitis c virus (hcv) infection and hcv genotypes of hemodialysis patients in salvador northeastern brazil. *Braz J Med Biol Res*, 39:595 – 602, 2006.
- [112] Cendoroglo Neto M. Epidemiologia da infecção pelos vírus da hepatite b e da hepatite c em pacientes renais crônicos submetidos à hemodiálise e capd, 1993.
- [113] Carvalho M, Branco PP, Luvizotto ML, and et al. High prevalence of hepatitis c v<sup>o</sup>rus infection in chronic hemodialysis patients. *Braz J Infect Dis*, 3:144 – 148, 2007.
- [114] Karohl C, Manfro RC, and Senger MB. Prevalência de anti-vírus da hepatite c em pacientes em hemodiálise crônica de porto alegre. *JBN*, 17:40 – 46, 1995.
- [115] Moraes CR. Hepatitis c virus infection in hemodialysis patients and workers. a case-control study in santa catarina state dialysis units. *Rev Inst Med Trop*, 43:66 – 66, 2001.
- [116] Naghettini AV, Daher RR, and Martin RMB. Soroprevalência do vírus da hepatite c na população em diálise de goiânia go.
- [117] Gongorra DVN. Serologic markers of hepatitis c virus infection among house-staff and patients of the dialysis unit of hospital das clinicas da fmusp. *Rev Soc Bras Med Trop*, 31:585 – 586, 1998.
- [118] Jadoul M, Cornu C, and van Ypersele de SC. Universal precautions prevent hepatitis c virus transmission: a 54 month follow-up of the belgian multicenter study the universitaires cliniques st-luc (ucl) collaborative group. *Kidney Int*, 53:1022 – 1025, 1998.
- [119] Furusyo N, Hayashi J, Kakuda K, and et al. Acute hepatitis c among japanese hemodialysis patients: a prospective 9-year study. *Am J Gastroenterol*, 96:1592 – 1600, 2001.
- [120] Fabrizi F, Lunghi G, Finazzi S, Colucci P, Pagano A, Ponticelli C, and Locatelli F. Decreased serum aminotransferase activity in patients with chronic renal failure: impact on the detection of viral hepatitis. *Am J Kidney Dis*, 38:1009 – 1015, 2001.

- [121] Bukh J, Wantzin P, Krogsgaard K, Knudsen F, Purcell RH, and Miller RH. High prevalence of hepatitis c virus (hcv) rna in dialysis patients: failure of commercially available antibody tests to identify a significant number of patients with hcv infection copenhagen dialysis hcv study group. *J Infect Dis*, 168:1343 – 1348, 1993.
- [122] Courouce AM, Le Marrec N, Girault A, Ducamp S, and Simon N. Anti-hepatitis c virus (anti-hcv) seroconversion in patients undergoing hemodialysis: comparison of second- and third-generation anti-hcv assays. *Transfusion*, 34:790 – 795, 1994.
- [123] Dalekos GN, Boumba DS, Katopodis K, Zervou E, Sferopoulos G, Elisaf M, Tsianos EV, and Siamopoulos KC. Absence of hcv viraemia in anti-hcv-negative haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 13:1804 – 1806, 1998.
- [124] Espinosa M, Martin-Malo A, varez de Lara M, Gonzalez R, Rodriguez M, and Aljama P. Natural history of acute hcv infection in hemodialysis patients. *Clin Nephrol*, 58:143 – 150, 2002.
- [125] Furusyo N, Hayashi J, and Ariyama I. Maintenance hemodialysis decreases serum hepatitis c virus (hcv) rna levels in hemodialysis patients with chronic hcv infection. *Am J Gastroenterol*, 95:490 – 496, 2000.
- [126] Umlauf F, Gruenewald K, Weiss G, Kessler H, Urbanek M, Haun M, Santner B, Koenig P, and Keeffe EB. Patterns of hepatitis c viremia in patients receiving hemodialysis. *Am J Gastroenterol*, 92:73 – 78, 1997.
- [127] Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Brezina M, Cole MJ, Vinson S, Mousa M, and Gitnick G. Biological dynamics of viral load in hemodialysis patients with hepatitis c virus. *Am J Kidney Dis*, 35:122 – 129, 2000.
- [128] Azevedo HA, Villela-Nogueira CA, Perez RM, Segadas-Soares JA, Takahashi C, Gaburo N, Pessoa I, and Coelho HS. Similar hcv viral load levels and genotype distribution among end-stage renal disease patients on hemodialysis and hcv-infected patients with normal renal function. *J Nephrol*, 20:609 – 616, 2007.

- [129] Natov SN, Lau JY, Bouthot BA, and et al. Serologic and virologic profiles of hepatitis c infection in renal transplant candidates new england organ bank hepatitis c study group. *Am J Kidney Dis*, 31:920 – 927, 1998.
- [130] Zamir D, Storch S, Zonder HB, Zamir C, and Weiner P. Hepatitis c virus seroconversion and genotype prevalence in patients and staff on chronic hemodialysis. *J Clin Gastroenterol*, 28:23 – 28, 1999.
- [131] Schneeberger PM, Keur I, van der V, van Hoek K, Boswijk H, van Loon AM, van Dijk WC, Kauffmann RH, and Quint W van Doorn LJ. Hepatitis c virus infections in dialysis centers in the netherlands: a national survey by serological and molecular methods. *J Clin Microbiol*, 36:1711 – 1715, 1998.
- [132] Pereira BJ, Natov SN, Bouthot BA, and et al. Effects of hepatitis c infection and renal transplantation on survival in end-stage renal disease. the new england organ bank hepatitis c study group. *Kidney Int*, 53:1374 – 1381, 1998.
- [133] Nakayama E, Akiba T, Marumo F, and Sato C. Prognosis of anti-hepatitis c virus antibody-positive patients on regular hemodialysis therapy. *J Am Soc Nephrol*, 11:1896 – 1902, 2000.
- [134] Stehman-Breen CO, Emerson S, Gretch D, and Johnson RJ. Risk of death among chronic dialysis patients infected with hepatitis c virus. *Am J Kidney Dis*, 32:629 – 634, 1998.
- [135] Bloom RD, Sayer G Fa K, Constantinescu S, Abt P, and Reddy KR. Outcome of hepatitis c virus-infected kidney transplant candidates who remain on the waiting list. *Am J Transplant*, 5:139 – 144, 2005.
- [136] Knoll GA, Tankersley MR, Lee JY, and et al. The impact of renal transplantation on survival in hepatitis c-positive end-stage renal disease patients. *Am J Kidney Dis*, 29:608 – 614, 1997.
- [137] Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Bunnapradist S, and Dulai G. Hepatitis c virus antibody status and survival after renal transplantation: meta-analysis of observational studies. *Am J Transplant*, 5:1452 – 1461, 2005.

- [138] Rao KV, Anderson WR, Kasiske BL, and Dahl DC. Value of liver biopsy in the evaluation and management of chronic liver disease in renal transplant recipients. *Am J Med*, 94:241 – 250, 1993.
- [139] Sezer S, Ozdemir BH, Arat Z, Turan M, Ozdemir NF, and Haberal M. Spectrum of liver damage and correlation with clinical and laboratory parameters in hcv infected hemodialysis patients. *Ren Fail*, 23:807 – 818, 2001.
- [140] Barril G. Hepatitis c virus-induced liver disease in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 15 Suppl 8:42 – 45, 2000.
- [141] Caramelo C, Ortiz A, Aguilera B, Porres JC, Navas S, Marriott E, Alberola ML, Alamo C, Galera A, and Garron MP. Liver disease patterns in hemodialysis patients with antibodies to hepatitis c virus. *Am J Kidney Dis*, 22:822 – 828, 1993.
- [142] Glicklich D, Thung SN, Kapoian T, Tellis V, and Reinus JF. Comparison of clinical features and liver histology in hepatitis c-positive dialysis patients and renal transplant recipients. *Am J Gastroenterol*, 94:159 – 163, 1999.
- [143] Cotler SJ, Diaz G, Gundlapalli S, Jakate S, Chawla A, Mital D, Jensik S, and Jensen DM. Characteristics of hepatitis c in renal transplant candidates. *J Clin Gastroenterol*, 35:191 – 195, 2002.
- [144] Luzar B, Ferlan-Marolt V, Brinovec V, and et al. Does end-stage kidney failure influence hepatitis c progression in hemodialysis patients? *Hepatogastroenterology*, 50:157 – 160, 2003.
- [145] Hu KQ, Lee SM, and Hu SX. Clinical presentation of chronic hepatitis c in patients with end-stage renal disease and on hemodialysis versus those with normal renal function. *Am J Gastroenterol*, 100:2010 – 2018, 2005.
- [146] Martin P, Carter D, Fabrizi F, and et al. Histopathological features of hepatitis c in renal transplant candidates. *Transplantation*, 69:1479 – 1484, 2000.

- [147] Pol S, Romeo R, Zins B, and et al. Hepatitis c virus rna in anti-hcv positive hemodialyzed patients: significance and therapeutic implications. *Kidney Int*, 44:1097 – 1100, 1993.
- [148] Bedossa P and Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis c. the metavir cooperative study group. *Hepatology*, 24:289 – 293, 1996.
- [149] Searle J, Kerr JFR, Halliday JW, and Powell LW. *Pathology of the liver*, chapter Iron storage disease, pages 219 – 241. Churchill Livingstone, 2002.
- [150] Okuda K, Hayashi H, Kobayashi S, and Irie Y. Mode of hepatitis c infection not associated with blood transfusion among chronic hemodialysis patients. *J Hepatol*, 23:28 – 31, 1995.
- [151] dos Santos JP, Loureiro A, Cendoroglo Neto M, and Pereira BJ. Impact of dialysis room and reuse strategies on the incidence of hepatitis c virus infection in haemodialysis units. *Nephrol Dial Transplant*, 11:2017 – 2022, 1996.
- [152] Sesso R. Inquérito epidemiológico em unidades de diálise do brasil. *J Bras Nefrol*, 22:23 – 26, 2000.
- [153] Cecka JM. The optn/unos renal transplant registry. *Clin Transpl*, pages 1 – 16, 2005.
- [154] Alter MJ. Epidemiology of hepatitis c. *Hepatology*, 26:62S – 65S, 1997.
- [155] Trevizoli JE. Aspectos epidemiológicos da hepatite c em pacientes portadores de insuficiência renal crônica submetidos a hemodiálise, 2004.
- [156] Pereira BJ and Levey AS. Hepatitis c virus infection in dialysis and renal transplantation. *Kidney Int*, 51:981 – 999, 1997.
- [157] Furusyo N, Hayashi J, and Kanamoto-Tanaka Y. Liver damage in hemodialysis patients with hepatitis c virus viremia: a prospective 10-year study. *Dig Dis Sci*, 45:2221 – 2228, 2000.
- [158] Yuki N, Ishida H, Inoue T, Tabata T, Matsushita Y, Kishimoto H, Kato M, Masuzawa M, Sasaki Y, Hayashi N, and Hori M. Reappraisal of biochemical hepatitis c activity in hemodialysis patients. *J Clin Gastroenterol*, 30:187 – 194, 2000.

- [159] Saab S, Martin P, Brezina M, Gitnick G, and Yee HF Jr. Serum alanine aminotransferase in hepatitis c screening of patients on hemodialysis. *Am J Kidney Dis*, 37:308 – 315, 2001.
- [160] Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, and Port FK. Comparison of mortality in all patients on dialysis patients on dialysis awaiting transplantation and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med*, 341:1725 – 1730, 1999.
- [161] Marcelli D, Stannard D, Conte F, and et al. Esrd patient mortality with adjustment for comorbid conditions in lombardy (italy) versus the united states. *Kidney Int*, 50:1013 – 1018, 1996.
- [162] Maisonneuve P, Agodoa L, Gellert R, and et al. Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. *Lancet*, 354:93 – 99, 1999.
- [163] Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Bunnapradist S, and Dulai G. Meta-analysis: Effect of hepatitis c virus infection on mortality in dialysis. *Aliment Pharmacol Ther*, 20:1271 – 1277, 2004.
- [164] Hanafusa T, Ichikawa Y, Kishikawa H, and et al. Retrospective study on the impact of hepatitis c virus infection on kidney transplant patients over 20 years. *Transplantation*, 66:471 – 476, 1998.
- [165] Mathurin P, Mouquet C, Poynard T, and et al. Impact of hepatitis b and c virus on kidney transplantation outcome. *Hepatology*, 29:257 – 263, 1999.
- [166] Morales JM, Dominguez-Gil B, Sanz-Guajardo D, and et al. The influence of hepatitis b and hepatitis c virus infection in the recipient on late renal allograft failure. *Nephrol Dial Transplant*, 19 Suppl 3:iii72 – iii76, 2004.
- [167] Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Hanson JA, and Kaplan B. Hepatitis c antibody status and outcomes in renal transplant recipients. *Transplantation*, 72:241 – 244, 2001.
- [168] Einollahi B, Hajarizadeh B, Bakhtiari S, Lesanpezeski M, Khatami MR, Nourbala MH, Pourfarziani V, and Alavian SM. Pretransplant hepatitis c virus infection and its effect

- on the post-transplant course of living renal allograft recipients. *J Gastroenterol Hepatol*, 18:836 – 840, 2003.
- [169] Huo TI, Yang WC, Wu JC, and et al. Long-term outcome of kidney transplantation in patients with hepatitis c virus infection. *Hepatogastroenterology*, 48:169 – 173, 2001.
- [170] Mahmoud IM, Elhabashi AF, Elsayy E, and et al. The impact of hepatitis c virus viremia on renal graft and patient survival: a 9-year prospective study. *Am J Kidney Dis*, 43:131 – 139, 2004.
- [171] Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D, and Matas AJ. Diabetes mellitus after kidney transplantation in the united states. *Am J Transplant*, 3:178 – 185, 2003.
- [172] Alric L, Di-Martino V, Selve J, Cacoub P, Charlotte F, Reynaud D, Piette JC, Peron JM, Vinel JP, Durand D, Izopet J, Poynard T, Duffaut M, and Rostaing L. Long-term impact of renal transplantation on liver fibrosis during hepatitis c virus infection. *Gastroenterology*, 123:1494 – 1499, 2002.
- [173] Kamar N, Rostaing L, Selves J, and et al. Natural history of hepatitis c virus-related liver fibrosis after renal transplantation. *Am J Transplant*, 5:1704 – 1712, 2005.
- [174] Knodell RG, Ishak KG, Black WC, and et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*, 1:431 – 435, 1981.
- [175] Ishak K, Baptista A, Bianchi L, and et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*, 22:696 – 699, 1995.
- [176] Marcellin P, Asselah T, and Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis c. *Hepatology*, 36:S47 – S56, 2002.
- [177] Gayotto LCC and Comitção SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. 19:137 – 140, 2000.
- [178] Guido M and Ruge M. Liver biopsy sampling in chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis*, 24:89 – 97, 2004.

- [179] Massard J, Ratziu V, Thabut D, and et al. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis c. *J Hepatol*, 44:S19 – S24, 2006.
- [180] Dattolo P, Lombardi M, Ferro G, Michelassi S, Cerrai T, and Pizzarelli F. Natural history of hcv infection and risk of death in a cohort of patients on long-term hemodialysis. *G Ital Nefrol*, 23:585 – 590, 2006.
- [181] Perez RM, Ferreira AS, Medina-Pestana JO, and et al. Is hepatitis c more aggressive in renal transplant patients than in patients with end-stage renal disease? *J Clin Gastroenterol*, 40:444 – 448, 2006.
- [182] Ferreira ASP. Análise comparativa das características bioquímicas e histológicas da infecção crônica pelo vírus da hepatite c entre portadores de insuficiência renal crônica em diálise e indivíduos com função renal normal, 2002.
- [183] Iotti A, Avagnina MA, Mando O, and et al. Liver histology in chronic hemodialysis patients infected with hepatitis c virus. *Medicina (B Aires)*, 57:541 – 545, 1997.
- [184] Akpolat I, Ozyilkan E, Karagoz F, Akpolat T, and Kandemir B. Hepatitis c in haemodialysis and nonuraemic patients: a histopathological study. *Int Urol Nephrol*, 30:349 – 355, 1998.
- [185] Rampino T, Arbustini E, Gregorini M, Guallini P, Libetta C, Maggio M, Ranghino A, Silini E, Soccio G, and Dal Canton A. Hemodialysis prevents liver disease caused by hepatitis c virus: role of hepatocyte growth factor. *Kidney Int*, 56:2286 – 2291, 1999.
- [186] Lemos LB, Perez RM, emos MM, and et al. Hepatitis c in chronic kidney disease: predialysis patients present more severe histological liver injury than hemodialysis patients? *Am J Nephrol*, 27:191 – 196, 2007.
- [187] Scamps Latscha B and Chatenoud L. T cells and b cells in chronic renal failure. *Semin Nephrol*, 16:183 – 191, 1996.
- [188] Sherman KE. Treatment of hepatitis c virus and human immunodeficiency virus co-infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 3:S118 – S121, 2005.

- [189] Sezer S, Tatal E, Aldemir D, Turkoglu S, Demirel OU, Afsar B, Ozdemir FN, and Haberal M. Hepatitis c infection in hemodialysis patients: Protective against oxidative stress? *Transplant Proc*, 38:406 – 410, 2006.
- [190] Teixeira R, Marcos LA, and Friedman SL. Immunopathogenesis of hepatitis c virus infection and hepatic fibrosis: New insights into antifibrotic therapy in chronic hepatitis c. *Hepatol Res*, 37:579 – 595, 2007.
- [191] Neuman MG, Benhamou JP, Marcellin P, and et al. Cytokine–chemokine and apoptotic signatures in patients with hepatitis c. *Transl Res*, 149:126 – 136, 2007.
- [192] Rysz J, Banach M, Cialkowska-Rysz A, Stolarek R, Barylski M, Drozd J, and Okonski P. Blood serum levels of il-2 il-6 il-8 tnf-alpha and il-1beta in patients on maintenance hemodialysis. *Cell Mol Immunol*, 3:151 – 154, 2006.
- [193] Fontaine H, Nalpas B, Poulet B, Carnot F, Zylberberg H, Brechot C, and Pol S. Hepatitis activity index is a key factor in determining the natural history of chronic hepatitis c. *Hum Pathol*, 32:904 – 909, 2001.
- [194] Fabrizi F, Bunnapradist S, Lunghi G, and Martin P. Kinetics of hepatitis c virus load during hemodialysis: novel perspectives. *J Nephrol*, 16:467 – 475, 2003.
- [195] Badalamenti S, Catania A, Lunghi G, Covini G, Bredi E, Brancaccio D, Salvadori M, Como G, Ponticelli C, and Graziani G. Changes in viremia and circulating interferon-alpha during hemodialysis in hepatitis c virus-positive patients: only coincidental phenomena? *Am J Kidney Dis*, 42:143 – 150, 2003.
- [196] Lopez-Labrador FX, Bracho MA, Berenguer M, and et al. Genetic similarity of hepatitis c virus and fibrosis progression in chronic and recurrent infection after liver transplantation. *J Viral Hepat*, 13:104 – 115, 2006.
- [197] Perez RM, Ferraz ML, Figueiredo MS, and et al. Unexpected distribution of hepatitis c virus genotypes in patients on hemodialysis and kidney transplant recipients. *J Med Virol*, 69:489 – 494, 2003.

- [198] Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, and Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *J Hepatol*, 34:730 – 739, 2001.

# **Anexos**

## A. 1 Termo de Responsabilidade

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_, estou sendo convidado para participar da pesquisa chamada “**ESTUDO DA HEPATITE C EM PACIENTES PORTADORES DE INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA EM HEMODIÁLISE NO DISTRITO FEDERAL**”.

A referida pesquisa possui como objetivo principal o estudo da hepatite C em pacientes portadores de doença renal crônica em tratamento com filtração do sangue (hemodiálise) no Distrito Federal.

Portador de insuficiência renal crônica apresenta hepatite viral mais freqüentemente comparada à pessoa sadia. Os dois principais agentes causadores desse tipo de hepatite em pessoas portadoras de insuficiência renal crônica são denominados de vírus da hepatite B e C. Atualmente, devido à vacinação contra o vírus da hepatite B, o vírus C tornou-se o mais importante. Como algumas pessoas que adquirem esse vírus não demonstram sinais da doença, é importante fazer os exames para o diagnóstico dessa infecção o mais precoce possível, o que possibilita o início do tratamento e evita a progressão da doença.

O vírus da hepatite C pode provocar hepatite crônica, podendo evoluir para cirrose e tumor de fígado. Além disso, nos pacientes submetidos a transplante renal, a doença causada pelo vírus da hepatite C pode progredir de forma mais acelerada.

Nesse estudo, será realizada uma entrevista com o paciente no próprio de tratamento e avaliação dos exames de sangue já realizados, anteriormente, na clínica de hemodiálise.

Caso o anticorpo contra o vírus da hepatite C mostrar-se presente ou apresente alterações nos exames do fígado, haverá a coleta de sangue para a realização de exame para detectar a presença do vírus. A coleta do sangue se fará na clínica que o paciente realiza o tratamento. A coleta ocorrerá antes do início da sessão, no momento da conexão com a máquina que filtra o sangue (hemodiálise). O transporte e o armazenamento do sangue para a realização desses exames serão de responsabilidade do coordenador da pesquisa. O sangue será encaminhado para o Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de

Brasília, onde será armazenado.

Sendo portador do vírus da hepatite C, serei convidado para comparecer ao ambulatório de gastroenterologia do Hospital de Base, com data previamente marcada, para avaliar a presença de doença no fígado causada pelo vírus da hepatite C. Essa avaliação consistirá na realização de consulta médica, exame físico e exames de sangue que detectam a função do fígado. Na unidade de gastroenterologia também será realizado um exame para avaliar o fígado, por meio de ultrasonografia abdominal. O exame não traz nenhum risco para a pessoa, pois utiliza onda sonora para construir a imagem do órgão.

O exame de endoscopia digestiva alta somente será realizado caso apresente aumento do tamanho do baço ou redução do número de plaquetas. Essas alterações podem significar um comprometimento avançado da doença e a realização do exame, nesses casos é importante para detectar a presença de varizes no esôfago. A endoscopia é feita utilizando-se de uma sonda introduzida pela boca, após anestesia local e medicação sedativa. Apesar de incomoda, não promove maiores riscos ao paciente.

Paciente cadastrado na lista de transplante renal e portador do vírus da hepatite C necessita realizar um exame de biópsia do fígado. A realização desse exame consta do protocolo do Serviço de Transplante Renal do Hospital de Base e consiste na retirada de um pequeno fragmento do fígado por meio de agulha própria, guiada pela ultrasonografia para o procedimento, sob anestesia local. A biópsia é importante para avaliar o grau de doença no fígado e decidir se é necessário o tratamento da hepatite, se é adequado à realização do transplante renal ou se é melhor permanecer em tratamento com hemodiálise. A biópsia será realizada após a verificação de adequada coagulação do sangue e após o procedimento, permanecerei no Hospital de Base sob observação, por um período de tempo suficiente para a completa recuperação. Nesse procedimento, além do desconforto da dor, existe o risco de sangramento abdominal, ocasionado pela punção. Caso necessário, deverei permanecer no hospital, sob a responsabilidade do coordenador da pesquisa, para controle da dor e complicações do procedimento. Estou sendo informado que o risco de ocorrência das complicações relacionadas ao procedimento são muito raras.

O material obtido da biópsia será encaminhado a Unidade de Anatomia Patológica,

onde será examinado e o resultado anexado ao prontuário. Nessa pesquisa não é prevista nenhuma forma de indenização ou ressarcimento.

Durante a realização da pesquisa, tenho direito e garantias, por parte do pesquisador, de que terei acesso a todos os resultados de exames realizados nesse estudo e a qualquer momento poderei obter informações e esclarecer eventuais dúvidas acerca da pesquisa que se iniciará. Além disso, os exames constarão no meu prontuário médico.

Antes do início da pesquisa ou durante a execução da mesma, tenho direito de não participar ou desistir da minha participação. A minha desistência não acarretará em qualquer prejuízo ao tratamento que realizo.

Além disso, a avaliação dos exames e do prontuário somente será realizada pelo pesquisador e todas as informações obtidas durante a pesquisa e os resultados dos exames terão garantia absoluta de sigilo, privacidade e a não haverá nenhuma forma de divulgação através do qual eu possa ser identificado.

O período de tempo programado para a obtenção dos resultados dos exames acima citados, serão de doze meses, a contar a partir da entrevista.

O sangue coletado e a biópsia serão utilizados exclusivamente para o projeto de pesquisa proposto. O material armazenado não será utilizado para outros estudos a não ser que nova autorização seja concedida. Caso isso seja impossível, o material biológico somente será utilizado mediante aprovação do novo projeto pelo Comitê de Ética e Pesquisa.

Os resultados da pesquisa serão publicados de forma científica e respeitando a ética em pesquisa em seres humanos, para aumentar o conhecimento médico a respeito da doença, para melhor tratar a mim e outros indivíduos.

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

RG do paciente: \_\_\_\_\_ Órgão Exp. \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

Assinatura do Paciente: \_\_\_\_\_

Nome do Responsável legal: \_\_\_\_\_

RG do Responsável: \_\_\_\_\_ Órgão Exp. \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

Assinatura do Responsável: \_\_\_\_\_

OBS. Em caso de qualquer dúvida ou outros esclarecimentos, favor entrar em contato com o coordenador da pesquisa ou o Comitê de Ética e Pesquisa da Secretaria de Saúde.

Telefone do COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA: 325 49 55

Coordenador da Pesquisa: JOSÉ EDUARDO TREVIZOLI

CRM 4472

UNIDADE DE GASTROENTEROLOGIA DO HOSPITAL DE BASE

BRASÍLIA – DF

Telefone: 325 50 01; 245 31 66.

Brasília – DF, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2002.

## **A.2 Pacientes portadores de VHC em hemodiálise**

ID	idade	IC	Sexo	peso	altura	IMC	TI	THD	TS	TXRI	DM	ALT	GE	CV	Fibrose	IP	IPP	IL	AI	TPI	esteatose	AC	LDB	ferro	PT	albumina	plaquetas	ST
1	43	31	M	58	1.65	21.30	12	12	s	n	não	27	1	515900	1	1	1	1	1	0.008	sim	não	não	ausente	6.7	3.6	185000	24
2	38	25	M	66	1.70	22.84	15	15	s	s	não	16	1	<615	0	1	0	0	0	0	não	não	não	4+/4	7.1	4	185000	30
3	54	42	M	71	1.78	22.41	12	12	s	n	não	22	1	98735	0	1	0	0	0	0	não	não	não	1+/4	7.4	3.8	208000	143
4	52	38	F	58	1.66	21.05	16	16	s	s	não	12	1	29008	0	1	0	1	1	0	sim	sim	não	3+/4	6.7	3.5	169000	48
5	55	44	M	52	1.58	20.83	11	7	n	n	não	21	1	103203	1	1	2	1	2	0.09	não	não	não	1+/4	6.9	3.4	225000	30
6	35	24	F	24	1.62	20.58	11	11	s	n	não	49	3	208499	0	1	0	0	1	0	não	não	não	ausente	6.3	3.6	240000	38
7	28	14	M	62	1.70	21.45	17	7	s	n	não	26	1	32505	1	2	0	1	1	0.05	não	não	não	ausente	6.5	3.5	354000	150
8	32	20	M	64	1.71	21.89	12	12	s	s	não	29	1	254831	3	1	0	0	0	0.02	não	não	não	ausente	6.2	2.1	186000	140
9	35	20	F	54	1.65	19.83	15	11	s	n	não	11	3	328697	2	2	1	1	1	0.13	sim	não	não	1+/4	7.3	3.8	281000	25
10	56	44	M	69	1.72	23.32	12	6	n	s	não	31	1	9362	1	1	0	0	0	0.08	não	não	não	2+/4	6	3.9	190000	31
11	48	41	M	59	1.68	20.90	7	4	n	n	não	17	1	<615	1	1	1	2	2	0.14	não	não	não	1+/4	6.8	4	195000	43
12	42	24	M	61	1.71	20.86	12	10	s	n	não	29	1	385135	0	1	0	0	0	0	não	não	não	2+/4	6.8	3.3	268000	56
13	38	25	M	45	1.60	17.58	15	8	s	s	não	85	1	615	0	0	0	1	1	0	não	não	não	2+/4	6.8	3.7	206000	33
14	45	22	F	61	1.65	22.41	19	16	s	n	sim	26	1	<615	0	0	0	1	1	0	sim	não	não	ausente	6.9	3.9	220000	34
15	23	15	M	79	1.67	28.33	9	7	n	s	não	11	1	857418	0	2	0	1	1	0	não	não	não	ausente	7.1	4.2	196000	56
16	29	22	M	69	1.71	23.60	8	4	n	s	não	12	1	<615	1	1	1	2	2	0.12	sim	não	não	ausente	7.1	3.9	187000	65
17	47	39	M	75	1.73	25.06	9	4	n	n	não	41	1	243485	2	2	2	1	2	0.22	sim	não	não	1+/4	6.5	3.8	252000	69
18	37	28	M	54	1.59	18.91	11	7	s	s	não	22	3	408155	0	1	0	0	0	0	não	sim	não	ausente	6.7	3.9	187000	55
19	32	22	F	51	1.62	19.43	10	5	n	n	sim	18	1	<615	0	1	0	0	0	0	não	não	não	2+/4	7.1	3.7	280000	154
20	39	25	F	56	1.64	20.82	15	10	s	s	não	30	1	414283	2	1	0	0	0	0.13	não	não	não	1+/4	6.9	3.8	240000	33
21	24	18	M	68	1.75	22.20	9	4	n	n	não	19	1	55866	0	3	2	1	2	0	não	não	não	ausente	6.5	3.9	217000	38
22	68	56	M	52	1.60	20.31	12	7	n	n	não	18	1	860	2	2	1	1	1	0.08	não	não	não	1+/4	6.3	3.1	174000	43
23	27	12	M	72	1.72	24.34	25	9	s	s	não	12	3	667	0	0	0	0	0	0	não	não	não	ausente	7.3	4	211000	35
24	24	14	M	71	1.69	24.86	18	10	s	s	não	75	1	3390070	1	1	2	1	2	0.05	não	não	não	3+/4	6.8	3.8	144000	37
25	47	37	F	48	1.68	17.01	10	10	s	n	não	35	1	670827	0	1	0	0	0	0	não	não	não	2+/4	6.7	3.7	170000	24
26	53	42	F	61	1.62	23.24	11	7	s	n	sim	31	1	226552	0	1	0	0	0	0	não	não	não	1+/4	7.4	4	188000	57
27	52	40	F	59	1.61	22.72	12	6	n	n	sim	11	1	615	2	2	2	1	2	0.16	não	não	não	3+/4	6.9	3.4	257000	29
28	41	34	F	61	1.60	23.83	8	8	s	n	não	24	1	1775210	1	1	1	2	2	0.12	não	não	não	ausente	6.9	3.4	162000	62
29	48	35	M	78	1.79	24.34	15	6	n	n	não	27	1	469493	0	1	0	0	0	0	não	não	não	3+/4	6.9	2.9	386000	44
30	35	25	F	58	1.68	20.55	10	7	n	n	não	13	1	7707	0	1	0	1	1	0	não	não	não	ausente	7	3.7	185000	116
31	46	34	F	69	1.65	25.34	12	2	s	s	não	26	1	135678	0	1	0	0	0	0	não	não	não	2+/4	7.1	3.8	130000	196
32	50	40	M	72	1.78	22.72	11	9	s	n	não	27	3	82152	1	2	2	1	2	0.09	não	não	não	1+/4	7.3	3.6	175000	26
33	42	36	F	60	1.72	20.28	6	3	s	n	não	31	1	78952	0	0	0	0	0	0	não	não	não	2+/4	7.1	3.2	207000	140
34	54	46	F	59	1.66	21.41	8	6	n	n	não	18	1	33765	3	1	1	1	1	0.33	não	não	sim	ausente	7	3.7	252000	18
35	48	36	M	58	1.72	19.61	12	6	s	s	sim	14	1	182451	0	0	0	0	0	0	não	não	não	ausente	7.2	4.2	196000	42
36	42	36	M	58	1.75	18.94	16	9	n	n	não	25	1	782054	1	1	1	1	1	0.06	não	não	não	1+/4	5.9	3	210000	21

ID = identificação; IC = idade de contaminação; TI = tempo de infecção; THD = tempo de hemodiálise; TS = transfusão de sangue; TX RI = transplante renal; DM = diabetes mellitus; ALT = alamina aminotransferase; GE = genótipo; IP = infiltrado inflamatório portal; IPT = infiltrado inflamatório periportal; IL = infiltrado inflamatório lobular; AI = atividade inflamatória Metavir; TPI = tempo de progressão indireta de fibrose; AC = acúmulo linfóide; LDB = lesão de ducto biliar; PT = proteína total; ST = saturação de transferrina

### **A.3 Pacientes portadores de VHC com função renal normal**

ID	idade	IC	Sexo	IMC	TI	DM	ALT	GE	CV	fibrose	IP	IPP	IN	AI	TPI	Esteatose	AC	LDB	ferro	PT	albumina	Plaquetas	ST
1	38	23	fem	20.20	15	não	45	1	3428205	3	2	3	1	3	0.2	sim	sim	sim	1+/4	7.9	3.76	247000	32
2	47	35	mas	25.46	12	não	48	1	845562	2	2	3	2	3	0.16	sim	sim	não	ausente	7.3	4.1	236000	36
3	42	26	fem	24.39	14	não	128	3	634265	2	2	2	2	2	0.14	sim	sim	sim	ausente	7.5	3.5	156000	28
4	32	16	fem	26.44	16	não	55	3	2016	1	2	2	2	2	0.06	sim	sim	não	ausente	7.9	4.4	261000	72
5	29	21	fem	23.05	8	não	49	1	43400	0	1	0	0	0	0	não	não	não	ausente	7.1	4.4	266000	65
6	56	43	mas	24.14	13	não	96	3	162000	1	2	3	3	3	0.07	sim	sim	não	ausente	7.9	3.5	285000	52
7	35	20	mas	21.97	15	não	87	1	589262	1	2	1	1	1	0.06	não	não	não	ausente	8.1	4.65	228000	51
8	56	44	fem	22.57	12	sim	18	3	654214	1	2	2	1	2	0.08	sim	sim	sim	1+/4	7.2	4.5	159000	28
9	30	16	mas	27.04	14	não	60	1	153562	0	1	0	1	0	0	sim	não	não	ausente	7.3	4.3	285000	55
10	38	25	fem	25.61	13	não	62	1	449779	1	2	2	1	2	0.07	sim	não	não	ausente	6.5	3.5	115000	24
11	48	36	fem	26.63	12	não	44	3	2318760	2	2	2	1	2	0.16	não	sim	não	ausente	7.6	4.1	232000	57
12	61	43	mas	33.71	18	sim	48	1	171165	1	2	1	1	1	0.05	sim	sim	não	ausente	8.5	4.22	210000	51
13	30	17	mas	25.36	13	não	75	1	1489046	3	3	3	1	3	0.23	não	sim	sim	1+/4	7.3	4	251000	32
14	42	33	mas	27.55	9	não	110	1	1245324	0	3	1	1	1	0	sim	sim	não	ausente	7.6	4.3	325000	35
15	32	25	fem	23.01	7	não	15	1	300793	1	0	1	2	2	0.14	não	não	não	ausente	8.6	3.7	234000	41
16	32	18	mas	20.06	14	não	80	3	3876000	3	1	2	1	2	0.21	sim	sim	não	1+/4	8.0	4.2	200000	41
17	34	26	mas	24.86	8	não	22	1	125600	2	2	2	1	2	0.14	não	não	não	ausente	8.9	4	191000	48
18	62	53	mas	27.18	9	sim	49	1	387940	1	2	3	1	3	0.11	sim	não	não	1+/4	7.2	4	130000	32
19	62	47	mas	29.00	15	sim	52	1	3157894	3	2	3	1	3	0.2	sim	não	não	2+/4	6.8	3.9	192000	28
20	33	28	fem	20.18	5	não	58	1	134237	0	2	1	1	1	0	sim	não	não	ausente	7.9	4.3	185000	56
21	25	18	fem	22.77	13	não	15	1	258607	0	1	0	1	0	0	sim	não	não	ausente	7	4.3	230000	21
22	38	20	mas	24.88	18	não	64	3	5245010	0	1	1	1	2	0	não	não	não	1+/4	7.9	4	223000	59
23	33	23	mas	27.04	10	não	48	1	7340	1	2	2	1	2	0.1	sim	sim	não	ausent	6.9	4.26	202000	25
24	41	31	mas	24.38	10	não	112	1	852761	2	3	3	2	3	0.2	não	sim	sim	ausente	7.8	4.3	180000	32
25	65	55	mas	24.84	2	não	99	1	182211	2	1	1	2	2	0.25	não	não	não	ausente	7.1	4.3	171000	48
26	39	24	fem	37.8	15	não	124	3	7340	1	2	1	1	1	0.06	sim	não	não	ausente	7.5	3.9	189000	54
27	62	44	fem	22.31	18	não	58	1	20000	0	1	1	0	2	0	não	não	não	ausente	8.1	4.9	258000	36
28	25	17	mas	28.12	8	não	66	3	1495551	0	2	1		1	0	sim	não	não	ausente	7.4	4.6	273000	34
29	43	32	mas	23.04	11	não	61	1	54795	2	2	1	1	2	0.18	não	não	não	ausente	7.1	4	310000	28
30	39	22	mas	24.15	17	não	17	1	589960	1	2	1	0	1	0.05	não	sim	não	ausente	7.8	4.1	315000	29
31	37	21	mas	23.72	16	não	45	1	223378	1	2	0	1	1	0.06	sim	sim	não	2+/4	7.9	4.3	211000	21
32	33	19	mas	23.62	15	não	46	1	343545	3	2	2	1	2	0.2	não	sim	não	1+/4	7.2	4.1	320000	51
33	33	23	mas	22.77	10	sim	49	2	3045020	0	1	0	1	0	0	não	não	não	ausente	7.8	4.4	280000	54
34	36	21	mas	24.56	15	não	78	1	50000	0	1	0	0	0	0	sim	não	não	2+/4	6.8	4	243000	23
35	49	31	fem	23.38	18	não	82	1	1202700	1	2	1	0	1	0.05	não	não	não	ausente	7.6	4.2	185000	65
36	48	35	fem	24.45	13	não	13	1	3095480	1	2	2	1	2	0.07	sim	não	não	ausente	7.2	3.8	129000	62
37	29	19	mas	22.40	13	não	91	3	551262	1	1	0	0	0	0.07	não	não	não	ausente	6.9	4	203000	28

ID = identificação; IC = idade de contaminação; IMC = índice de massa corporal; TI = tempo de infecção; DM = diabetes mellitus; ALT = alanina aminotransferase; CE = genótipo; IP = infitrado inflamatório portal; IPP = infitrado inflamatório periportal; IL = infitrado inflamatório lobular; AI = atividade inflamatória Metavir; TPI = taxa de progressão indireta da fibrose; AC = acúmulo linfóide; LDB = lesão de ducto biliar; PT = proteína total; ST = saturação de transferrina.

**A.4 "Carta de Aceite" para publicação do artigo intitulado *Hepatitis C Is Less Aggressive in Hemodialysis Patients than in Nonuremic Patients* enviada pelo *Editor-in-Chief* do periódico *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* e *Proof* do artigo (em formato .pdf) aceito para a publicação**

CJASN IS NOW INDEXED IN MEDLINE AND CAN BE ACCESSED ON PUB MED!

Dear Dr. Trevizoli,

We are pleased to inform you that your manuscript is now suitable for publication and will appear in the next available issue of the Clinical Journal of the American Society of Nephrology.

The final version of your manuscript will need to be uploaded into Manuscript Central as a revised manuscript. Please submit the text and tables in one Word file. Your figures will need to be uploaded as a TIFF or EPS file. Specific instructions regarding the requirements for the figures are attached to this email. You will also find more detailed help with your figures at this website: <http://www.cadmusknowledgeworks.com/>

Please note check list below for manuscript guidelines.

You will be receiving page proofs of your paper before it goes to press. These MUST be reviewed and corrections made within 48 hours of receipt. If there is any possibility the corresponding author might not be available, please arrange to have page proofs read by another author to avoid any delay in this process. CJASN cannot publish material that has not been proof read by the authors. Delay will result in a delay in publication of your paper.

It is a pleasure to receive and publish manuscripts of this quality in CJASN. We deeply appreciate your support of the Journal, and we look forward to the opportunity to consider further manuscripts from your group.

Sincerely yours,

William M. Bennett, M.D.  
Editor-in-Chief, CJASN

Harold I. Feldman, M.D.  
Mohamed H. Sayegh, M.D.  
Deputy Editors, CJASN

## Hepatitis C Is Less Aggressive in Hemodialysis Patients than in Nonuremic Patients

Jose Eduardo Trevizoli,\* Raissa de Paula Menezes,<sup>†</sup> Lara Franciele Ribeiro Velasco,<sup>‡</sup> Regina Amorim,<sup>§</sup> Mauro Birche de Carvalho,<sup>†</sup> Liliana Sampaio Mendes,<sup>†</sup> Columbano Junqueira Neto,<sup>†</sup> José Roberto de Deus Macedo,<sup>||</sup> and Francisco de Assis Rocha Neves<sup>¶</sup>

\*Hospital de Base do Distrito Federal, Secretaria de Estado de Saúde (SES), Brasília, DF, Brazil; and Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil; <sup>†</sup>Hospital de Base do Distrito Federal, SES, Brasília, DF, Brazil; <sup>‡</sup>Sabin Institute and Laboratory of Clinical Analysis, Brasília, DF, Brazil; <sup>§</sup>Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil; <sup>||</sup>Hospital Santa Luzia, Brasília, DF, Brazil; and <sup>¶</sup>Laboratório de Farmacologia Molecular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

**Background and objectives:** The severity of liver disease among hepatitis C patients on hemodialysis is controversial. The aim of this study was to compare the clinical, biochemical, and liver histologic characteristics of hepatitis C virus (HCV) in hemodialysis patients and in those with normal renal function.

**Design, setting, participants, & measurements:** A case-control study was carried out with 36 HCV patients on hemodialysis and 37 HCV patients with normal renal function matched for gender, age at infection, and estimated time of infection.

**Results:** HCV patients on hemodialysis had lower levels of alanina aminotransferase and lower viral load. Hepatic fibrosis was significantly higher in the patients with normal renal function (73%) than in hemodialysis patients (47.2%,  $P < 0.025$ ); the same was observed for inflammatory activity (control group 59.5% versus hemodialysis patients 27.7%,  $P = 0.003$ ). In addition, the risk of tissue inflammation was four times lower in hemodialysis patients (odds ratio = 0.23,  $P < 0.004$ ), and severe inflammatory activity on biopsy was the only independent risk factor for fibrosis ( $P < 0.001$ ).

**Conclusions:** The lower biochemical and inflammatory activities observed in hemodialysis patients suggest that hemodialysis and uremia may have a protective role against progression of the disease caused by HCV.

*Clin J Am Soc Nephrol* ●●: ●●●–●●●, 2008. doi: 10.2215/CJN.01330308

**H**epatitis C is the main cause of chronic liver disease in patients with end-stage renal disease (ESRD). The prevalence of hepatitis C virus antibody (anti-HCV) is high, between 3.4% and 32.1%, among hemodialysis (HD) patients and potential kidney transplant candidates (1). Despite the decrease in the incidence of newly acquired HCV infections observed in recent years, which may be attributable to the efficient serologic HCV tests used in blood transfusions and to the use of erythropoietin to treat anemia, contamination by HCV still occurs in HD units (2).

Patients infected with HCV who undergo renal transplantation show a higher risk for progression to severe liver disease, death, and graft failure after transplantation compared with anti-HCV negative recipients (3). Liver disease should consequently be staged at the time of kidney transplantation because patients with cirrhosis or advanced fibrosis will have a poorer prognosis (4).

The natural history of chronic liver disease caused by HCV in HD patients remains unknown (4–6). HCV infection increases mortality rates in uremic patients, and cirrhosis and other liver-related deaths are more frequent in HCV-infected dialysis patients than in those without the virus (5–7).

Results from liver biopsies of HCV-infected dialysis patients are limited (1,2), and the rate of bridging hepatic fibrosis and liver cirrhosis ranges from 5% to 32% (8–15). Whether the liver disease caused by HCV shows a different clinical course in HD patients and in patients with normal renal function is still controversial. Barril (8) reported that progression time to cirrhosis can be much shorter in HCV-infected HD patients than in patients with normal renal function. However, other studies suggest that HCV-infected HD patients present a lower degree of inflammatory activity and a lower stage of liver fibrosis compared with HCV-infected patients with normal renal function (9,12,15). Indeed, the effects of chronic uremia and HD on HCV-related liver disease and on the progression of liver fibrosis in HCV-infected patients with ESRD remain unknown.

To investigate the impact of chronic renal failure and HD on the progression of hepatitis C in patients awaiting kidney transplantation, we compared clinical, biochemical, virologic, and histologic findings in HCV-infected patients with ESRD receiving HD treatment and in HCV-infected patients with normal

Received March 20, 2008. Accepted June 16, 2008.

Published online ahead of print. Publication date available at [www.cjasn.org](http://www.cjasn.org).

**Correspondence:** Dr. José Eduardo Trevizoli, SQS 111, Bloco D, Apartamento 403, CEP 70374-040, Brasília, DF, Brazil. Phone: +55-61-3245-3166; Fax: +55-61-3445-1402; Email: [jetrevizoli@terra.com.br](mailto:jetrevizoli@terra.com.br)

tapraid4/cjn-cjasn/cjn-cjasn/cjn00508/cjn2664-08a moyerr S=8 6/25/08 20:06 Art: 01330308 Input-jjp

2 Clinical Journal of the American Society of Nephrology

Clin J Am Soc Nephrol ●●: ●●●-●●●, 2008

renal function. Our results showed that HCV-infected patients on HD presented lower levels of alanine aminotransferase (ALT), lower viral load, and less inflammatory activity and fibrosis in their liver biopsies. Moreover, severe inflammatory activity was the only independent risk factor for liver fibrosis. Taken together, our results strongly suggest that chronic hepatitis C is less aggressive in HD patients than in nonuremic patients.

## Materials and Methods

This case-control study was conducted from January 2000 to December 2006 and included 36 HD patients enrolled in the kidney transplant waiting list of Hospital de Base do Distrito Federal, Brasília, Distrito Federal, Brazil. Subjects were selected among 761 patients with ESRD who had been treated for at least 6 mo in seven HD units located in the metropolitan area of Brasília. From this population, 101 patients were positive for anti-HCV antibody (enzyme-linked immunosorbent assay 3) and 76 patients were HCV RNA positive. Of these 76 patients, 36 had been submitted to liver biopsy because they were awaiting renal transplantation (case group). The control group comprised 37 HCV-infected patients with normal renal function, defined by creatinine  $\leq 1$  mg/dl.

Date of onset of HCV infection was estimated considering the date when HD was initiated or the year when the patient received a blood transfusion (if before the beginning of HD) in the study group, and the date of the first blood transfusion in the control group. Exclusion criteria for both groups were: coinfection with hepatitis B virus or HIV, chronic use of steroids, interferon, or ribavirin; other liver diseases; intravenous drug use; alcohol consumption of more than 40 g/d for men and 20 g/d for women. The control group was paired with the study group for age, sex, and estimated time of HCV infection. All patients underwent clinical, biochemical, serologic, virologic, sonographic, and histologic studies, and the results were compared between the two groups.

### Clinical Data

Data about age, sex, risk factors, estimated date of onset of HCV infection, possible HCV transmission mode, body mass index and history of diabetes mellitus were obtained from clinical history and review of charts. The diagnosis of diabetes mellitus was made according to reports of use of oral hypoglycemic agents or insulin and fasting glycemia level ( $>110$  mg/dl).

### Laboratory Studies

Blood samples were collected for the following laboratory tests: glucose, ALT, total proteins, albumin, platelets, transferrin saturation, and prothrombin activity (International Normalized Ratio). ALT levels were calculated as the mean of the three tests performed in the 6 mo before the first biopsy, whereas the other tests were carried out around the date of the liver biopsy.

### Serologic and Molecular Tests

Patients were tested for anti-HCV antibody using a third-generation enzyme-linked immunosorbent assay (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Blood samples were collected from ESRD patients before HD sessions. The samples were centrifuged and sera were frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  in up to 2 h. HCV RNA was assessed by polymerase chain reaction (PCR) using a commercial kit (Amplicor, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). To measure HCV RNA level, a semiautomated branched DNA (bDNA) assay was used (Versant HCV RNA 3.0 Quantitative, Bayer Corporation, Tarrytown, NY). The genotype was determined with an

automated sequencing technique using the ET DYE Terminator kit and the P17 primer for the 5' UTR and S2 for the NS5B region (MegaBACE 1000 GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). The sequences were analyzed using the basic local algorithm search tool (BLAST software) and aligned with the HCV sequences available in data banks ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), <http://hcv.lanl.gov>).

### Histologic Tests

Liver biopsy specimens were classified as adequate if they were at least 1.5 cm long and had 10 or more portal spaces. Histologic tests were conducted by a pathologist blinded to clinical and laboratory findings. Fibrosis and inflammatory activity were staged according to the Metavir scale (16). The presence of lymphoid follicles, bile duct lesion, liver steatosis, and iron deposits in liver tissue (Perls stain) was also recorded.

### Statistical Analysis

Descriptive data were presented as percentages or means with SD and range. Categorical variables were analyzed with the  $\chi^2$  test and Fisher exact test. The *t* test and Mann-Whitney test were used for comparison of numerical variables. Logistic regression models were used to calculate odds ratios (95% confidence interval) and the corresponding *P* values. The level of significance was set at 0.05 ( $\alpha = 5\%$ ). Statistical analyses were performed using the SPSS 13.0 software for Windows.

### Approval by Research Ethics Committee

The study protocol followed the Helsinki Declaration and was approved by the Research Ethics Committee at Hospital de Base do Distrito Federal. All patients included signed an informed consent form after receiving information about the study.

## Results

Among the 76 HD patients infected by HCV, 36 who were in the kidney transplant list were included in the study, as well as 37 HCV-infected patients with normal renal function. No difference was observed between the 36 HD patients awaiting kidney transplantation and the remaining 40 HD patients who were not enrolled in the kidney transplant list in terms of ALT, total proteins, albumin, platelets, transferrin saturation, prothrombin activity (International Normalized Ratio), and abdominal ultrasound.

Patients with uncontrolled liver disease with ascites, encephalopathy, esophageal varices, or jaundice were not included in the study because isolated kidney transplantation is not indicated for them. Table 1 shows data about sex, age, estimated time since onset of HCV infection, and presence of diabetes; all these parameters were similar in the two groups. Body mass index, ALT, albumin, and total protein levels were significantly lower in uremic patients on HD. The distribution of HCV genotypes was similar in both groups. Notwithstanding, the viral load was significantly lower in HD patients ( $P = 0.016$ ).

The hepatic histologic findings for both groups are shown in Table 2. Liver steatosis and lymphoid follicles, two histologic findings associated with liver disease caused by HCV, were significantly more frequent in the patients with normal renal function than in patients on HD (56.8% versus 16.3% and 43.2% versus 5.6%, respectively;  $P < 0.001$ ). Iron deposits in liver tissue

Table 1. Baseline characteristics in both groups

Variable	Group with ESRD ( <i>n</i> = 36) [mean ± SD (range) or n (%)]	Group with NRF ( <i>n</i> = 37) [mean ± SD (range) or n (%)]	<i>P</i>
Matched variables, age at entry (yr)	41 ± 10 (23-68)	40 ± 11 (25-65)	0.699 <sup>a</sup>
Gender			
male	22 (61.1)	23 (62.2)	0.96 <sup>b</sup>
female	14 (38.9)	14 (37.8)	
Estimated HCV infection (yr)	12.31 ± 3.80 (6-25)	12.54 ± 3.78 (2-18)	0.374 <sup>c</sup>
Hemodialysis (yr)	8 ± 3 (2-16)		
BMI	21.80 ± 2.31 (17.01-28.33)	25.01 ± 3.39 (20.06-37.8)	<0.001 <sup>a</sup>
DM			
yes	5 (13.9)	4 (10.8)	0.736 <sup>d</sup>
no	31 (86.1)	33 (89.2)	
Genotype			
1	29 (80.5)	26 (70.2)	0.308 <sup>b</sup>
2	0 (0)	1 (2.7)	
3	7 (19.5)	10 (27.1)	
Load viral (UI/ml) × 10 <sup>3</sup>	380 ± 641 (0.6-3 390)	1 010 ± 1 314 (2-5 245)	0.018 <sup>c</sup>
ALT (U/L)	26 ± 15 (11-85)	61 ± 30 (13-128)	<0.001 <sup>c</sup>
Platelets × 10 <sup>3</sup>	214 ± 52 (130-386)	224 ± 54 (115-325)	0.417 <sup>a</sup>
Albumin g/dl	3.63 ± 0.40 (2.1-4.2)	4.12 ± 0.31 (3.5-4.9)	<0.001 <sup>a</sup>
Total protein (g/dl)	6.83 ± 0.37 (5.9-7.4)	7.54 ± 0.53 (6.5-8.9)	<0.001 <sup>a</sup>
Transferrin saturation (%)	60.69 ± 46.54 (18-196)	41.46 ± 14.45 (21-72)	0.246 <sup>c</sup>

HCV, hepatitis C virus; BMI, body mass index; DM, diabetes mellitus; ALT, alanine aminotransferase.

<sup>a</sup>*t* test.

<sup>b</sup>χ<sup>2</sup> test.

<sup>c</sup>Mann-Whitney test.

<sup>d</sup>Fisher's exact test.

were more frequent and more intense in patients on HD than in patients with normal renal function (*P* = 0.008).

The prevalence of liver fibrosis in patients with ESRD receiving HD treatment was 47.2%, significantly lower than the rate found in patients with normal renal function (73%; *P* = 0.025). Furthermore, significant fibrosis (stages 2 and 3, Metavir) was found in 32.5% of the patients with normal renal function and in only 17.1% of those on HD, although this difference did not reach significance (*P* = 0.118). Liver cirrhosis (stage 4 fibrosis) was not found in any of the study groups (Table 2).

Inflammatory activity of the liver was significantly lower in HD patients. As shown in Table 2, absence of or light inflammation (stages 0 and 1) was observed in 39% and 33.3% of the HD patients, respectively, a much higher result than the one found in nonuremic patients: 16.2% and 24.3%, respectively. On the other hand, moderate inflammation (stage 2) was increased in nonuremic patients (40.5%) compared with HD patients (27.7%). It is noteworthy that, whereas severe inflammatory activity (stage 3) was found in 19% of the patients with normal renal function, none of the uremic patients displayed severe inflammatory disease. Consequently, moderate and severe inflammatory activity (stages 2 and 3, Metavir) was twice as frequent in patients with normal renal function as in patients with ESRD on HD (59.5% versus 27.7%; *P* = 0.003). Taken together, these results clearly demonstrate the greater intensity of inflammation and fibrosis in patients with normal renal function.

Univariate analysis revealed four factors correlated with the presence of liver fibrosis: no renal failure (*P* = 0.027), severe inflammatory activity (*P* < 0.001), lymphoid follicles (*P* = 0.029), and no iron in liver tissue (*P* = 0.0022). Nevertheless, multivariate analysis (Table 3) showed that the only independent risk factor for fibrosis was severe inflammatory activity in liver biopsy (*P* < 0.001). Inflammatory activity was associated with an increase of 15.2 in the relative risk of fibrosis.

Interestingly, the analysis of risk factors associated with severe inflammatory activity showed that patients with elevated ALT (*P* = 0.017) and with lymphoid follicles (*P* = 0.020) had biopsies with stage 2 or 3 inflammation more frequently. However, HD patients showed signs of significantly less severe inflammatory activity than patients with normal renal function (9 of 36 versus 22 of 37; *P* = 0.004). Multivariate analysis revealed that chronic kidney disease and HD reduced the occurrence of severe inflammatory activity. Patients with ESRD on HD had a four times lower risk for tissue inflammation than patients with normal renal function (odds ratio = 0.23; *P* < 0.004, Table 3).

## Discussion

The prevalence of HCV infection among HD patients is substantially greater compared with patients with normal renal function (1). HCV infection is currently the most common cause of chronic liver disease in HD patients (4). The natural history of hepatitis C in patients with ESRD is hard

tapraid4/cjn-cjasn/cjn-cjasn/cjn00508/cjn2664-08a	moyerr	S=8	6/25/08	20:06	Art: 01330308	Input-jjp
---	--------	-----	---------	-------	---------------	-----------

4 Clinical Journal of the American Society of Nephrology

Clin J Am Soc Nephrol ●●●●●●●●, 2008

Table 2. Histopathologic changes among hemodialysis and normal renal function patients

Variable	Group with ESRD ( <i>n</i> = 36) [mean ± SD (range) or n (%)]	Group with NRF ( <i>n</i> = 37) [mean ± SD (range) or n (%)]	<i>P</i>
Fibrosis staging			
0	19 (52.8)	10 (27)	0.025 <sup>a</sup>
1	11 (30.6)	15 (40.5)	
2	4 (11.1)	7 (19.5)	
3	2 (5.5)	5 (13)	
4	0 (0)	0 (0)	
Inflammatory activity			
0	14 (39)	6 (16.2)	0.003 <sup>a</sup>
1	12 (33.3)	9 (24.3)	
2	10 (27.7)	15 (40.5)	
3	0 (0)	7 (19)	
Steatosis			
yes	6 (16.3)	21 (56.8)	<0.001 <sup>a</sup>
no	30 (83.3)	16 (43.2)	
Lymphoid aggregate			
yes	2 (5.6)	16 (43.2)	<0.001 <sup>b</sup>
no	34 (94.4)	21 (56.8)	
Bile duct injury			
yes	1 (2.8)	4 (10.8)	0.358 <sup>b</sup>
no	35 (97.2)	33 (89.2)	
Iron			
0	14 (38.9)	27 (73)	0.008 <sup>a</sup>
1	10 (27.8)	7 (18.9)	
2	7 (19.4)	3 (8.1)	
3	4 (11.1)	0 (0)	
4	1 (2.8)	0 (0)	

<sup>a</sup> $\chi^2$  test.<sup>b</sup>Fisher's exact test.

Table 3. Multivariate analysis of the variables associated with fibrosis (stage I-IV) and inflammatory activity (II-IV) in all patients

Variable	OR (95% CI)	<i>P</i>
Fibrosis		
ESRD	—	0.401
inflammatory activity	15.167 (3.957-58.137)	<0.001
lymphoid aggregate	—	0.169
iron	—	0.129
Inflammatory		
ESRD	0.227 (0.084-0.618)	0.004
lymphoid aggregate	—	0.213
ALT	—	0.679

OR, odds ratio; CI, confidence interval; ESRD, end-stage renal disease; ALT, alanine aminotransferase.

to evaluate because of the high mortality rate among them, the difficulty to make diagnoses in cases of acute hepatitis, and the slow progression of liver disease caused by HCV. Prospective studies have reported greater mortality rates in

HCV-infected HD patients than in noninfected patients (6,17,18). The reason for this result has not been defined, but it has been suggested that it may be associated with liver disease and liver cancer (6,17).

Studies assessing liver histology revealed that the inflammatory activity tends to be mild or moderate, whereas the presence of bridging fibrosis ranges from 3% to 11%, and of cirrhosis, from 0% to 24% in uremic patients (2). The rate of progression of liver fibrosis and the identification of which factors affect the natural history of HCV-infected patients have not been established, and some reports suggest that HD may act as a protective factor and reduce the rate of progression of liver disease (19).

In the present study, we compared the natural course of HCV infection in HD patients with patients with normal renal function. ALT level, viral load, prevalence of fibrosis, and inflammatory activity were significantly lower in HD patients than in nonuremic patients. Multivariate analysis revealed that severe inflammatory activity in liver biopsy was the only independent risk factor for liver fibrosis in these patients (relative risk = 15) and that uremia and/or HD therapy was a protective factor for severe liver inflammation (relative risk = 0.227).

The lower degree of inflammatory activity and liver fibrosis

tapraid4/cjn-cjasn/cjn-cjasn/cjn00508/cjn2664-08a	moyerr	S=8	6/25/08	20:06	Art: 01330308	Input-ijp
---	--------	-----	---------	-------	---------------	-----------

Clin J Am Soc Nephrol ●●: ●●●-●●●, 2008

Hepatitis C in Hemodialysis Patients

5

in our HD patients is similar to findings described by other groups (9,12,13,15). We did not observe any association between inflammation and duration of HD treatment, although Sezer *et al.* (14) have reported that the longer the time on HD, the lower the degree of liver inflammation. Sterling *et al.* (15) have also reported that inflammatory activity and fibrosis were less intense in HD patients, although these differences were restricted to patients with elevated ALT as observed in our patients. In addition, HD patients have been described to have less advanced fibrosis and a lower degree of liver inflammation when compared with chronic renal failure patients not requiring dialysis (13,20) or to patients who underwent renal transplantation (19,21,22).

The mechanism by which uremia and HD may exert a protective effect on HCV liver inflammation remains unknown. The dysfunction of B and T cells (23,24), elevated levels of hepatocyte growth factor (25), and changes in the antioxidant system in the serum of HD patients (26) are factors that may be associated with lower liver inflammation. Regardless of the reasons, lower liver inflammation in HD patients may contribute to a delay in the progression of liver disease because the rate of inflammatory activity is associated with fibrosis progression (27).

In this study, no association was found between fibrosis and age, sex, body mass index, age at onset of infection, platelets, albumin, transferrin saturation, steatosis, bile duct lesion, or lymphoid follicles in liver biopsy. These findings were similar to those reported by other authors that studied patients with ESRD (9,13–15).

Iron deposits in the liver, a factor that may stimulate fibrogenesis caused by HCV, were more frequent and more intense in our HD patients ( $P = 0.008$ ). This finding has been associated with blood transfusions and frequent supplementation of iron in patients with ESRD. However, our data did not show a correlation between iron deposits and liver fibrosis in HD patients or in patients with normal renal function.

The distribution of HCV genotypes was similar in the two groups. Contrarily, the viral load was significantly higher in patients with normal renal function ( $P = 0.016$ ). Although dialysis patients have immune compromise resulting from uremia, the HCV viral load of HD patients is usually low, and this may be the result of the clearance of HCV RNA during HD, the adherence of viral particles to the dialysis membrane, or the release of cytokines (28,29). Badalamenti *et al.* (30) found a reduction in viral load during HD associated with the simultaneous elevation of interferon-alpha levels, and concluded that this might contribute to the fact that the disease is less aggressive in dialysis patients.

Genotype and viral load were not associated with histologic findings of liver biopsy in our study; this result is in accordance with reports by other authors involving both HD patients (13) and those with normal renal function (31).

Similarly to other studies, we found that HD patients had significantly lower ALT levels than patients with normal renal function (9,14). Univariate analysis of data from patients with elevated ALT levels showed more frequent severe inflammatory activity ( $P = 0.017$ ), but significance was not found in the

multivariate analysis ( $P = 0.679$ ). Furthermore, we did not find a correlation between elevated ALT and fibrosis ( $P = 0.167$ ), which indicates that enzyme levels do not predict the severity and stage of histologic changes in HD patients. Therefore, liver biopsy remains a valuable tool in the evaluation of liver disease in HCV-infected patients.

The limitations of this study should be carefully considered. HD patients were restricted to candidates for kidney transplantation because, in our service, these patients are submitted to liver biopsy to assess the stage of fibrosis. On the other hand, HCV-positive patients on HD who were not awaiting kidney transplantation are not submitted to liver biopsy because there is no consensus about whether these patients should be treated for HCV. Additionally, although we excluded patients with history of alcohol consumption, hepatitis B virus, or HIV coinfection and uncontrolled severe liver disease, there is a risk that HD patients with more severe illnesses (*i.e.*, with a worse liver function) were not referred to kidney transplantation, in contrast with the group of patients with normal kidney function, who were referred for the accurate management of their liver disease. To examine this possibility, we compared the levels of ALT, total proteins, albumin, platelets, transferrin saturation, prothrombin activity (International Normalized Ratio), and abdominal ultrasound between the 36 HD patients infected by HCV referred to kidney transplantation and the 40 RNA HCV-positive patients on regular HD who were not on the list. Our results did not reveal any difference between the two groups.

## Conclusion

This study showed that HCV-infected patients receiving HD treatment had lower ALT levels and viral loads, and their liver biopsies showed a lower degree of inflammatory activity and less fibrosis compared with patients with normal renal function. Less inflammatory activity in serum and liver tissue indicates that HD and uremia may have a protective role against progression of HCV-associated liver disease, and further studies should be conducted to identify the factors in uremic patients that affect the progression of liver disease.

## Disclosures

There are no conflicts of interests associated with the publication of this paper.

## References

1. Fabrizi F, Poordad FF, Martin P: Hepatitis C infection and the patient with end-stage renal disease. *Hepatology* 36: 3–10, 2002
2. Meyers CM, Seeff LB, Stehman-Breen CO, Hoofnagle JH: Hepatitis C and renal disease: an update. *Am J Kidney Dis* 42: 631–657, 2003
3. Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Bunnapradist S, Kanwal F, Dulai G: Post-transplant diabetes mellitus and HCV seropositive status after renal transplantation: meta-analysis of clinical studies. *Am J Transplant* 5: 2433–2440, 2005

tapraid4/cjn-cjasn/cjn-cjasn/cjn00508/cjn2664-08a	moyerr	S=8	6/25/08	20:06	Art: 01330308	Input-ijp
---	--------	-----	---------	-------	---------------	-----------

6 Clinical Journal of the American Society of Nephrology

Clin J Am Soc Nephrol ●●: ●●●-●●●, 2008

4. Gane E, Pilmore H: Management of chronic viral hepatitis before and after renal transplantation. *Transplantation* 74: 427-437, 2002
5. Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Bunnapradist S, Dulai G: Meta-analysis: effect of hepatitis C virus infection on mortality in dialysis. *Aliment Pharmacol Ther* 20: 1271-1277, 2004
6. Nakayama E, Akiba T, Marumo F, Sato C: Prognosis of anti-hepatitis C virus antibody-positive patients on regular hemodialysis therapy. *J Am Soc Nephrol* 11: 1896-1902, 2000
7. Pereira BJ, Natov SN, Bouthot BA, Murthy BV, Ruthazer R, Schmid CH, Levey AS: Effects of hepatitis C infection and renal transplantation on survival in end-stage renal disease: the New England Organ Bank Hepatitis C Study Group. *Kidney Int* 53: 1374-1381, 1998
8. Barril G: Hepatitis C virus-induced liver disease in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 15[Suppl 8]: 42-45, 2000
9. Cotler SJ, Diaz G, Gundlapalli S, Jakate S, Chawla A, Mital D, Jensik S, Jensen DM: Characteristics of hepatitis C in renal transplant candidates. *J Clin Gastroenterol* 35: 191-195, 2002
10. Glicklich D, Thung SN, Kapoian T, Tellis V, Reinus JF: Comparison of clinical features and liver histology in hepatitis C-positive dialysis patients and renal transplant recipients. *Am J Gastroenterol* 94: 159-163, 1999
11. Hu KQ, Lee SM, Hu SX, Xia VW, Hillebrand DJ, Kyulo NL: Clinical presentation of chronic hepatitis C in patients with end-stage renal disease and on hemodialysis versus those with normal renal function. *Am J Gastroenterol* 100: 2010-2018, 2005
12. Luzar B, Ferlan-Marolt V, Brinovec V, Lesnicar G, Klopčič U, Poljak M: Does end-stage kidney failure influence hepatitis C progression in hemodialysis patients? *Hepatogastroenterology* 50: 157-160, 2003
13. Martin P, Carter D, Fabrizi F, Dixit V, Conrad AJ, Artinian L, Peacock V, Han S, Wilkinson A, Lassman CR, Danovitch G: Histopathological features of hepatitis C in renal transplant candidates [see comment]. *Transplantation* 69: 1479-1484, 2000
14. Sezer S, Ozdemir BH, Arat Z, Turan M, Ozdemir NF, Haberal M: Spectrum of liver damage and correlation with clinical and laboratory parameters in HCV infected hemodialysis patients. *Ren Fail* 23: 807-818, 2001
15. Sterling RK, Sanyal AJ, Luketic VA, Stravitz RT, King AL, Post AB, Mills AS, Contos MJ, Shiffman ML: Chronic hepatitis C infection in patients with end stage renal disease: characterization of liver histology and viral load in patients awaiting renal transplantation. *Am J Gastroenterol* 94: 3576-3582, 1999
16. Bedossa P, Poynard T: An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C: the METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 24: 289-293, 1996
17. Espinosa M, Martin-Malo A, Alvarez de Lara MA, Aljama P: Risk of death and liver cirrhosis in anti-HCV-positive long-term haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 16: 1669-1674, 2001
18. Stehman-Breen CO, Emerson S, Gretch D, Johnson RJ: Risk of death among chronic dialysis patients infected with hepatitis C virus. *Am J Kidney Dis* 32: 629-634, 1998
19. Perez RM, Ferreira AS, Medina-Pestana JO, Cendoroglo-Neto M, Lanzoni VP, Silva EB, Ferraz ML: Is hepatitis C more aggressive in renal transplant patients than in patients with end-stage renal disease? *J Clin Gastroenterol* 40: 444-448, 2006
20. Lemos LB, Perez RM, Lemos MM, Lanzoni VP, Draibe SA, Silva IS, Silva AE, Ferraz ML: Hepatitis C in chronic kidney disease: predialysis patients present more severe histological liver injury than hemodialysis patients? *Am J Nephrol* 27: 191-196, 2007
21. Alric L, Di-Martino V, Selves J, Cacoub P, Charlotte F, Reynaud D, Piette JC, Péron JM, Vinel JP, Durand D, Izopet J, Poynard T, Duffaut M, Rostaing L: Long-term impact of renal transplantation on liver fibrosis during hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 123: 1494-1499, 2002
22. Kamar N, Rostaing L, Selves J, Sandres-Saune K, Alric L, Durand D, Izopet J: Natural history of hepatitis C virus-related liver fibrosis after renal transplantation. *Am J Transplant* 5: 1704-1712, 2005
23. Scamps-Latscha B, Chatenoud L: T cells and B cells in chronic renal failure. *Semin Nephrol* 16: 183-191, 1996
24. Yoon JW, Gollapudi S, Pahl MV, Vaziri ND: Naive and central memory T-cell lymphopenia in end-stage renal disease. *Kidney Int* 70: 371-376, 2006
25. Rampino T, Arbustini E, Gregorini M, Guallini P, Libetta C, Maggio M, Ranghino A, Silini E, Soccio G, Dal Canton A: Hemodialysis prevents liver disease caused by hepatitis C virus: role of hepatocyte growth factor. *Kidney Int* 56: 2286-2291, 1999
26. Sezer S, Tural E, Aldemir D, Türkoglu S, Demirel OU, Afsar B, Ozdemir FN, Haberal M: Hepatitis C infection in hemodialysis patients: protective against oxidative stress? *Transplant Proc* 38: 406-410, 2006
27. Fontaine H, Nalpas B, Poulet B, Carnot F, Zylberberg H, Brechot C, Pol S: Hepatitis activity index is a key factor in determining the natural history of chronic hepatitis C. *Hum Pathol* 32: 904-909, 2001
28. Fabrizi F, Bunnapradist S, Lunghi G, Martin P: Kinetics of hepatitis C virus load during hemodialysis: novel perspectives. *J Nephrol* 16: 467-475, 2003
29. Mizuno M, Higuchi T, Yanai M, Kanmatsuse K, Esumi M: Dialysis-membrane-dependent reduction and adsorption of circulating hepatitis C virus during hemodialysis. *Nephron* 91: 235-242, 2002
30. Badalamenti S, Catania A, Lunghi G, Covini G, Bredi E, Brancaccio D, Salvadori M, Como G, Ponticelli C, Graziani G: Changes in viremia and circulating interferon-alpha during hemodialysis in hepatitis C virus-positive patients: only coincidental phenomena? *Am J Kidney Dis* 42: 143-150, 2003
31. Massard J, Ratzu V, Thabut D, Moussalli J, Lebray P, Benhamou Y, Poynard T: Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 44[Suppl]: S19-S24, 2006